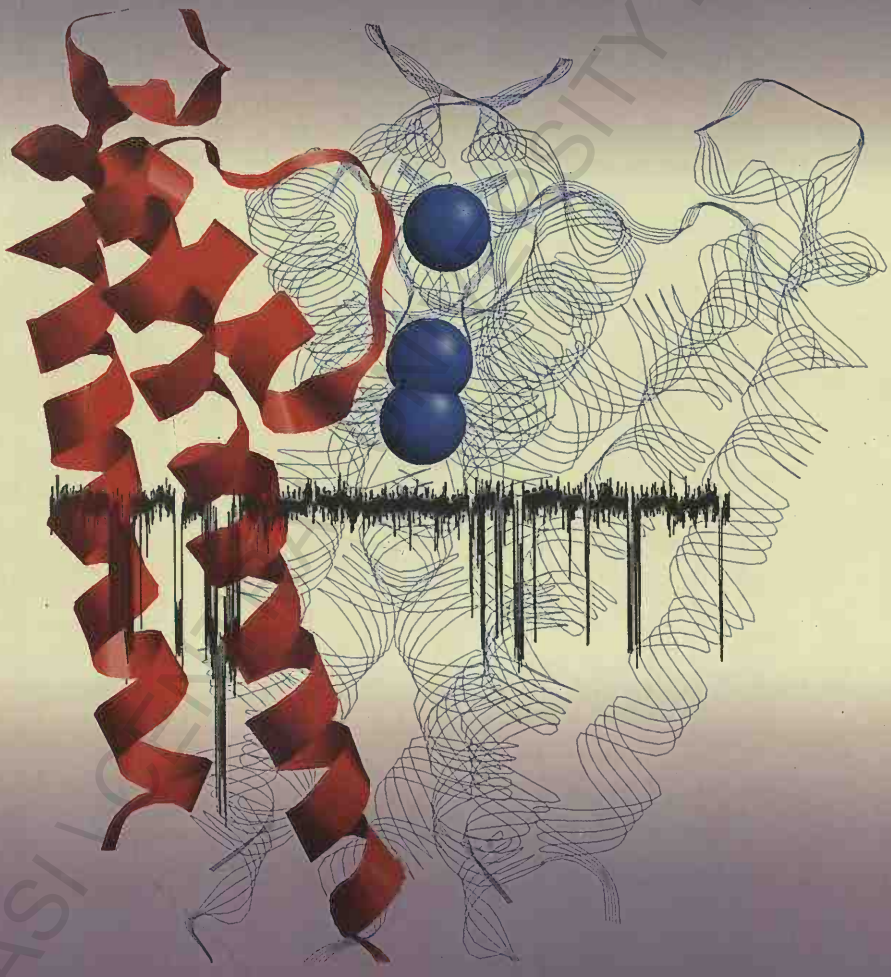
Tudor LUCHIAN

ELECTROFIZIOLOGIE MOLECULARĂ

TEORIE ŞI APLICAŢII



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III-13.631

editura sed com libris

BIBLIOTECA CENTR. UNIV.
"M. EMINESCU" IAŞI
FIZICĂ
III-13.631

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Electrofiziologie moleculară
Teorie şi aplicaţii

Cu cele mai bune gânduri,
Tudor Luchian

BCU IAŞI \ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Referenți științifici:

Profesor Maria Luiza FLONTA
(Universitatea din Bucureşti, România)
Profesor Ioan KOSZTIN
(University of Missouri – Columbia, SUA)

Corector: Loredana Cristina MEREUȚĂ

Redactor: Petru RADU

Revizia textelor: Alina HUCAI

Tehnoredactare computerizată,
concepția şi realizarea copertei:Cristian Adrian OLARIU

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

LUCHIAN, TUDOR
Electrofiziologie moleculară: teorie şi aplicații /
Tudor Luchian. – Iaşi: Sedcom Libris, 2006
Bibliogr.
I.S.B.N.: 973-670-154-9

612.014.42:576.314(075.8)

Editura Sedcom Libris este acreditată de Consiliul Național al Cercetării Științifice din Învățământul Superior (C.N.C.S.I.S.).

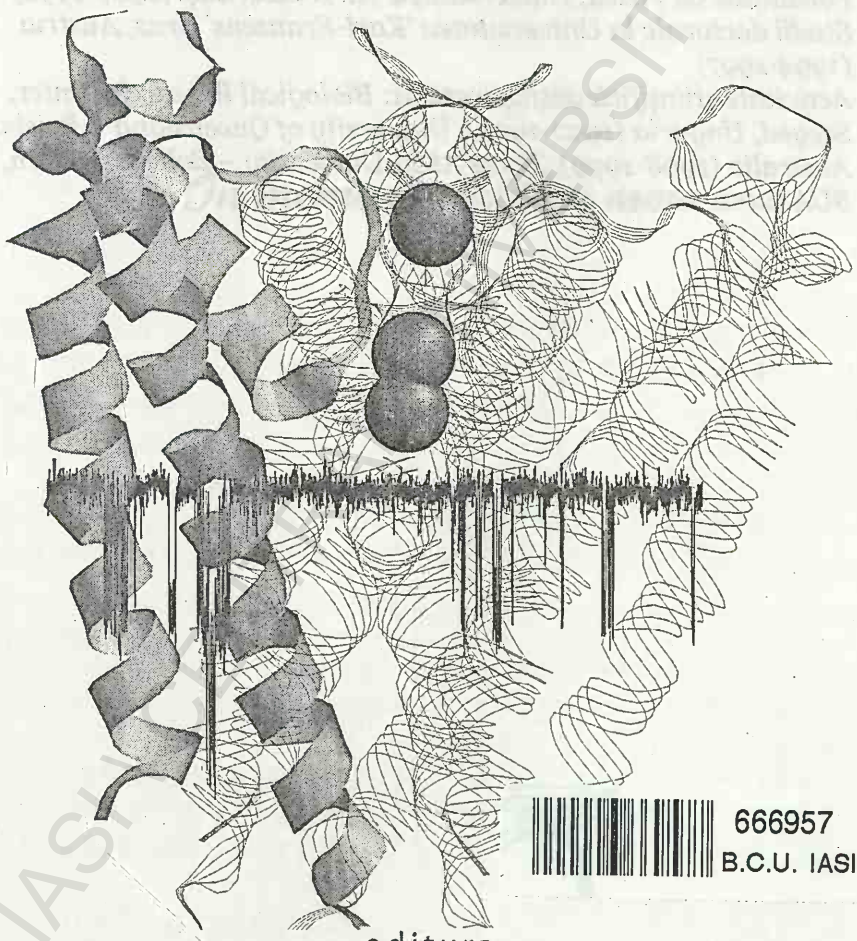
Copyright © 2006, SEDCOM LIBRIS
Toate drepturile asupra prezentei ediții sunt rezervate Editurii Sedcom Libris, Iaşi. Reproducerea parțială sau integrală a textelor, prin orice mijloc, precum şi a graficii copertei, fără acordul scris al Editurii Sedcom Libris, este interzisă şi se va pedepsi conform legislației în vigoare.

Adresa Editurii: Şos. Moara de Foc nr. 4, cod 700527, Iaşi, România
Tel.: 0232.242.877; 234.582; 0742.76.97.72; fax: 0232.233.080
www.sedcom.ro; e-mail: editurasedcomlibris@yahoo.com

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tudor LUCHIAN

Electrofiziologie moleculară
Teorie şi aplicaţii



666957
B.C.U. IASI

editura
sed com
libris

BCU IAŞI
UNIVERSITY LIBRARY

Despre autor:

Data şi locul naşterii:

Februarie 26, 1968, Fălticeni, România

Educaţie:

- *Liceul 'Nicu-Gane', Fălticeni (1982-1986)*
- *Facultatea de Fizică, Universitatea 'Al. I. Cuza' Iaşi (1987-1992)*
- *Studii doctorale la Universitatea 'Karl-Franzens' Graz, Austria (1994-1997)*
- *Activitate ştiinţifică desfăşurată la: Biological Research Center, Szeged, Ungaria (1992-1993), University of Queensland – Brisbane, Australia (1998-1999), Texas A&M University – College Station, SUA (2001-2003)*

BCU IASI \ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În memoria tatălui meu

BCU IASI \ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

CUVÂNT ÎNAINTE 9

1 PERSPECTIVA CLASICĂ ASUPRA INTERACȚIUNII DINTRE BIOMEMBRANE ŞI PARTICULE ÎNCĂRCATE ELECTRIC 11

2 CANALE IONICE: NOȚIUNI FUNDAMENTALE DE STRUCTURĂ ŞI FUNCȚIE 31

2.1. Canale ionice de potasiu. Caracteristici generale structurale şi funcționale 42
2.2. Canale ionice de sodiu. Caracteristici generale structurale şi funcționale 45
2.3 Porinele: proteine specializate cu rol în transportul de substanță prin biomembrane 57
2.3.1 Porine nespecifice 61
2.3.2 Porine specifice 68

3 DESCRIEREA MICROSCOPICĂ A FENOMENELOR DE TRANSPORT CU APLICAȚII ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ 73

3.1 Descrierea mişcării browniene cu ajutorul formalismului lui Langevin 78
3.2 Ecuația Fokker – Planck 90

4 DESCRIEREA MACROSCOPICĂ A MIŞCĂRII BROWNIENE. SOLUȚIA ECUAȚIEI DE DIFUZIE ÎN CAZURI PARTICULARE 103

4.1 Sursa punctuală de particule difuzante 111
4.2 Caracterizarea difuziei induse dintr-un semi-spațiu 113
4.3 Caracterizarea difuziei într-un domeniu spațial limitat, mărginit de valori constante ale concentrației particulelor difuzante 117

5 ECUAȚIA LUI NERNST. CIRCUITUL ELECTRIC ECHIVALENT AL UNEI MEMBRANE CU PROPRIETĂȚI DE SEMIPERMEABILITATE IONICĂ 119

6 DESCRIEREA ŞI CARACTERIZAREA POTENȚIALULUI DE DIFUZIE 129

7 ECUAȚIA LUI GOLDMAN. REPREZENTAREA ELECTRICĂ ECHIVALENTĂ A UNEI MEMBRANE BIOLOGICE PERMEABILE PENTRU MAI MULTE SPECII IONICE 137

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8 TEORIA LUI EYRING DE DESCRIERE MACROSCOPICĂ A FENOMENELOR DE TRANSPORT PRIN NANOPORI. IMPLEMENTAREA MODELULUI EYRING *'TWO-SITES-THREE-BARRIERS'* 147

9 METODA *'VOLTAGE-CLAMP'* ŞI UTILITATEA EI ÎN ELECTROFIZIOLOGIA MOLECULARĂ 157

10 METODA *'PATCH-CLAMP'* DE STUDIERE A PROPRIETĂȚILOR FIZICE ALE CANALELOR IONICE, LA NIVEL DE SINGURĂ MOLECULĂ 173

10.1 Analiza schemei bloc a unui amplificator utilizat în măsurători tip *'patch-clamp'* 180
10.2 Analiza funcției de transfer a unui circuit de conversie curent-tensiune 187
10.3 Analiza de zgomot electric a unui convertor curent-tensiune 191
10.4 Zgomotul electric indus de elementele de circuit externe convertorului curent-tensiune 202

11 ANALIZA STOCHASTICĂ A PROPRIETĂȚILOR CINETICE ALE NANOPORILOR BIOLOGICI 205

11.1 Metoda *'noise analysis'* de studiere a proprietăților cinetice şi de transport ale canalelor ionice 209
11.2 Analiza globală a proprietăților canalelor ionice din înregistrări experimentale de tip *'patch-clamp'* 227
11.3 Analiza spectrală generalizată a unei biomembrane excitabile 239

ANEXE 249

1. Protocol experimental pentru realizarea membranelor lipidice artificiale 249
2. Protocol experimental pentru pregătirea măsurătorilor de electrofiziologie pe canale ionice GIRK1/GIRK4 exprimate genetic în oocite de la broasca *Xenopus Laevis* 260
   2.1 Buffer solutions 260
   2.2. Oocyte preparation 260
   2.3. Injection of the mRNA 261
   2.4. Single-channel recording 261
3. Codul genetic standard 262
4. Simbolurile utilizate pentru aminoacizi 263
5. Constante fizice universale 264

Bibliografie 264 265

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUVÂNT ÎNAINTE

„Biology today is where physics was at the beginning of the twentieth century; it is faced with a lot of facts that need an explanation."

Jose Onuchic, co-director of the Centerfor Theoretical Biologicul Physics (CTBP) at the University of California, Sun Diego. Nature 419, 244 – 246 (19 September 2002)

Atât din punct de vedere ştiinţific, dar şi social, una din cele mai inspirate 'aventuri' ale curiozităţii umane a fost cea de încercare de reducere a complexităţii sistemelor biologice şi de abordare a acestora prin prisma unor principii şi legităţi fizico-matematice simple. În acest sens, nu atât descrierea, dar mai ales înţelegerea şi abordarea predictivă a fenomenelor biologice a constituit fundamentul de dezvoltare a unei ştiinţe, ce poate părea 'intimidantă' prin complexitatea fenomenelor abordate: biofizica. Plecând de la explicarea unor fenomene aparent simple pentru biologia celulară şi ajungând până la descrierea la nivel molecular a unor proteine vitale pentru lumea biologică, explicarea modului de comunicare celulară şi contribuţii la elaborarea de protocoale ştiinţifice utilizabile în terapia genetică, rolul biofizicianului poate deveni extrem de delicat. Astfel, el trebuie să poată conduce pe ambele sensuri ale 'drumului' ce leagă biologia de fizică şi matematică, şi să poată percepe pragmatic provocările actuale ale universului bio- ce pot fi abordate integrativ prin prisma unor legităţi fizice şi matematice esenţiale. Probabil că acest cuvânt introductiv ar fi trebuit să fie denumit *'Ce este şi ce nu este această carte'*. Această carte se doreşte a fi o expunere comprehensivă de cunoştinţe ştiinţifice, ce pot servi ca un bun punct de plecare pentru aprofundarea conceptuală a unei secţiuni importante din biofizică, dată de electrofiziologia moleculară. În urma experienţei acumulate până în prezent, prin implicarea nemijlocită în domeniul biofizicii moleculare, am încercat să expun cititorului câteva din conceptele-cheie ale domeniului ştiinţific abordat, aşa cum le-am perceput personal. Suplimentar, am urmărit ca într-o măsură cât mai mare, ceea ce transmit cititorului în această carte să provină şi din experienţa mea nemijlocită; astfel, multe din rezultatele de sinteză prezentate în această lucrare au fost elaborate prin derularea unor proiecte ştiinţifice din domeniul biofizicii, în care am avut şansa să fiu direct implicat. *Ce nu este această carte?* Este esenţial de înţeles că această carte nu este o *'Biblie'*; astfel, autorul nu are pretenţia că ar fi elaborat o lucrare suficientă prin ea însăşi, pentru completa înţelegere de către cititor a problematicilor electrofiziologiei moleculare şi celulare. Ca şi pentru orice alt domeniu ştiinţific, pot să apreciez că pentru o percepere cât mai judicioasă a ideilor prezentate (şi) în această carte,

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
FIZICĂ

consultarea unei bibliografii multidisciplinare (i.e., matematică, statistică, chimie, fizică, biologie şi electronică) nu poate decât să sporească şansele de succes ale cititorului interesat de acest domeniu ştiinţific. Măsura în care această lucrare se va dovedi utilă atât pentru neofiţi, dar şi pentru profesioniştii ce lucrează în acest domeniu, rămâne singura coordonată de referinţă ce poate defini această carte.

BCU IASI \ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1 PERSPECTIVA CLASICĂ ASUPRA INTERACȚIUNII DINTRE BIOMEMBRANE ŞI PARTICULE ÎNCĂRCATE ELECTRIC

Viabilitatea oricărei celule vii este condiționată de existența schimburilor de materie între ea şi mediul înconjurător. Pentru a menționa doar câteva exemple esențiale în acest sens, amintim că toate celulele viabile trebuie să-şi asigure modalități şi mecanisme de transfer intracelular a compuşilor macroergici, precum şi pentru exocitoza compuşilor chimici toxici rezultați în urma proceselor de metabolism celular. De asemenea, transferul ionilor anorganici prin biomembrane, precum şi menținerea unor gradienți de concentrație electrolitică între mediile intra- şi, respectiv, extracelular pentru celule sau diferite organele celulare, reprezintă condiții *sine-qua-non* pentru comunicarea inter-celulară, prin intermediul potențialelor de acțiune. Exocitoza controlată a ionilor de calciu din compartimente specifice intracelulare este, de asemenea, vitală pentru desfăşurarea fenomenului de contracție musculară, precum şi pentru trigerarea unor procese moleculare specifice, urmare a interacțiunii dintre unele celule şi stimuli hormonali. Ca un alt exemplu în care transportul ionic transmembranar este esențial, trebuie amintit că, de o parte şi de alta a membranei plasmatice a celulelor mucosale din stomac şi în condiții fiziologice normale, sunt menținuți gradienți extrem de mari ai concentrației ionilor de hidrogen, pentru a asigura condiții optime de digestie a hranei ingerate.

Pentru toate aceste exemple care încearcă să surprindă un aspect general al fiziologiei celulare, şi anume transportul de ioni şi molecule hidrofile prin biomembrane, vom demonstra că difuzia ionică este un proces care ar trebui să se desfăşoare optim doar cu consum de energie; în absența unei surse externe de energie, fluxurile transmembranare ale acestor ioni şi molecule hidrofile ar trebui să fie extrem de mici şi irelevante pentru buna desfăşurare a reacțiilor biologice celulare.

BCU IAŞI - CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

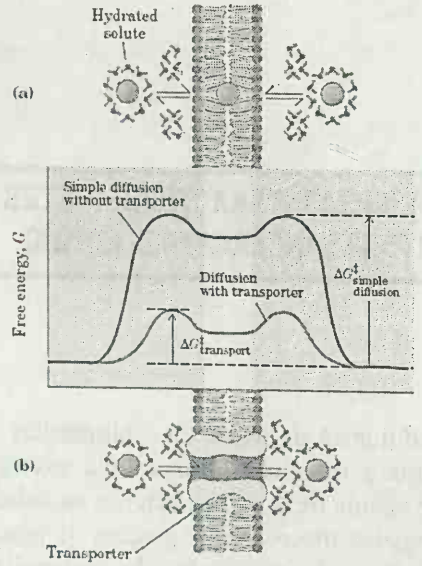


Figura 1 Reprezentarea schematică a barierelor de energie liberă ce sunt asociate cu translocarea unor molecule hidrofile prin biomembrane în absența (a) și prezența (b) unor transportori membranari ('*transporters*'). În absența unor proteine specifice transportoare, bariera energetică, asociată cu forțele de interacțiune electrostatice între moleculele hidrofile și sarcinile electrice induse la interfața mediu apos – biomembrană este mult mai mare decât energia de agitație termică a acelor molecule hidrofile, și deci fluxul lor prin biomembrane este extrem de redus. Prezența proteinelor transportoare în biomembrane, poate conduce la scăderea dramatică a acestor bariere energetice, facilitând considerabil transportul moleculelor hidrofile (adaptat din D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry,* Fourth Edition, W. H. Freeman, 2004).

Cu toate acestea, în cele mai multe procese biologice – vezi exemplele menționate mai sus – transferul prin biomembrane al unor compuși din categoria celor menționați mai sus se face fără consum energetic și cu rate de transfer optime pentru fiziologia și metabolismul celular. Pentru a înțelege substratul fizic al fenomenelor de transport prin biomembrane și pentru a identifica principalele paradigme fizice ale acestor fenomene, haideți să răspundem inițial la o întrebare cheie: de ce nu sunt biomembranele structuri moleculare care să faciliteze *per se* transportul ionilor și al moleculelor hidrofile ??

Pentru a facilita înțelegerea de către cititor a semnificațiilor fizice ale mărimilor ce vor fi utilizate în continuare, facem o sumară trecere în revistă a unor noțiuni fundamentale din electrodinamică și electrostatică. Aici, ca și în întreg conținutul acestei cărți, din considerente de tehnoredactare, vom omite utilizarea simbolului 'săgeată' așezat deasupra oricărei litere ce semnifică o mărime vectorială. Cu toate acestea, oricând va fi cazul, vom face specificații clare asupra mărimilor fizice implicate de utilizarea acestor vectori (e.g., referire doar la modulul vectorului, specificații asupra unui produs scalar sau vectorial al unor vectori etc.)

Unul din efectele existenței unor câmpuri electrice în medii dielectrice este manifestarea fenomenului de polarizabilitate electrică ce este caracterizat primar de inducerea în acel mediu dielectric a unor orientări spațiale preferențiale pentru moleculele polare din mediul respectiv sau/și de inducere a unor momente electrice dipolare tranzitorii în molecule ce aveau momentul dipolar nul în absența câmpului electric 'sursă' (pentru detalii fizice referitoare la descrierea fenomenelor de polarizare indusă, cititorul este încurajat să-și suplimenteze informațiile prin consultarea unui tratat bun de electrodinamică clasică – recomandarea autorului este volumul II al splendidelor cursuri de fizică '*Feynman Lectures on Physics*', ed. R. P. Feynman, R.B. Leighton, & M. Sands).

Prin definiţie, pentru orice mediu dielectric considerat simplificat ca fiind omogen, vectorul polarizabilitate se defineşte ca fiind momentul dipolar mediu al unităţii de volum:

$$P(r)=\sum_i n_i\langle p_i\rangle \tag{1}$$

unde $\langle p_i\rangle$ este momentul dipolar mediu al moleculelor de tip 'i', a căror număr pe unitate de volum este n_i, iar sumarea de mai sus este de tip vectorial.

Din electrodinamica clasică, ştim că unui mediu oarecare având volumul 'V' şi suprafaţa externă 'S', în care momentul dipolar mediu este diferit de zero, i se poate asocia existenţa unei sarcini electrice de polarizare a cărei densitate volumică este dată de:

$$\rho_{volume}(r)=-div[P(r)] \tag{2}$$

şi a unei distribuţii superficiale de sarcină a cărei densitate măsurată pe 'S' este dată de produsul scalar între vectorul polarizabiliate (P) şi vectorul unitate (n), normal la suprafaţa 'S' :

$$\sigma_{superficial}=P(r)n \tag{3}$$

(facem aici precizarea suplimentară că într-o regiune spaţială în care există un câmp electric fără surse, singura posibilitate de existenţă a unei densităţi volumice de polarizare diferită de zero este ca proprietăţile dielectrice ale acelui mediu să fie variabile în raport cu coordonatele spaţiale).

Astfel, în prezenţa unor sarcini electrice fixe cu densitatea volumică ρ_f şi a unor sarcini de polarizare de volum (ρ_{volume}), binecunoscuta ecuaţie a lui Poisson se scrie:

$$div[E(r)]=\frac{\rho_f(r)+\rho_{volume}(r)}{\varepsilon_0}=\frac{1}{\varepsilon_0}\{\rho_f(r)-div[P(r)]\} \tag{4}$$

Într-o formulare echivalentă, şi în care să apară ca sursă de câmp electric doar densitatea volumică de sarcină electrică fixă, ecuaţia de mai sus se scrie:

$$div[\varepsilon_0 E(r)+P(r)]=\rho_f(r) \tag{5}$$

Suma vectorială ($\varepsilon_0 E(r)+P(r)$) se numeşte vector deplasare electrică şi se notează cu D(r). În medii izotrope extinse spaţial până la infinit şi în aproximaţia de liniaritate a efectelor de polarizare induse, vectorul polarizare electrică indus (efect) de prezenţa unui câmp electric E (cauză) se consideră a fi direct proporţională cu vectorul câmp electric E:

UAIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$P(r) = \varepsilon_0 \chi_e E(r) \tag{6}$$

unde constanta de proporţionalitate χ_e se numeşte susceptivitate electrică, este un scalar şi este caracteristică fiecărui material dielectric.

Cu aceste notaţii, vectorul deplasare electrică se defineşte astfel:

$$D(r) = \varepsilon_0 E(r) + P(r) = \varepsilon_0 E(r) + \varepsilon_0 \chi_e E(r) = \varepsilon_0 E(r)(1 + \chi_e) \tag{7}$$

În această expresie, cantitatea $(1 + \chi_e)$ se numeşte constanta dielectrică relativă a mediului dielectric respectiv, şi se notează cu ε_r.

Cu această notaţie, se vede uşor că ecuaţia lui Poisson se mai poate scrie:

$$div[E(r)] = \frac{1}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \rho_f(r) \tag{8}$$

Esenţa acestei ecuaţii fundamentale pentru întreaga electrostatică este simplă: într-un mediu dielectric, câmpul electric cauzat de sarcinile fixe cu densitatea volumică ρ_f este redus în intensitate cu factorul $(\frac{1}{\varepsilon_r})$, faţă de cazul în care respectivele sarcini fixe s-ar fi aflat în vid. Aşa după cum este cunoscut din fizica clasică, prezenţa unui câmp electric într-un mediu oarecare este asociată cu prezenţa unei energii de natură electrică în acel sistem fizic. Din electrodinamica clasică, este ştiut că densitatea volumică de energie $(w_e = \frac{dE_e}{dV})$ asociată cu prezenţa într-un mediu polarizabil a unui câmp electric (E) este dată de expresia:

$$w_e = \frac{1}{2} ED \tag{9}$$

unde:

- E este vectorul câmp electric ce caracterizează liniile de câmp electric din mediul polarizabil;
- D este vectorul deplasare electrică;
- ED este produsul scalar al vectorilor câmp şi, respectiv, deplasare electrică.

Cu aceste informaţii preliminare, suntem într-o poziţie relativ bună de a înţelege de ce un ion, de exemplu, nu poate difuza de la sine printr-o biomembrană. Pentru a ne continua însă optim raţionamentul în acest sens, să ne reamintim câteva noţiuni de structură a biomembranelor. Membranele celulelor biologice sunt suprastructuri moleculare ce izolează fiecare celulă vie de mediul înconjurător,

BUCAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

definind astfel compoziţia moleculară intracelulară şi menţinând diferenţe esenţiale între compoziţia mediului intracelular şi cel extracelular. Membrana oricărei celule vii reprezintă un element de filtrare foarte selectiv pentru ionii şi moleculele implicate în procese celulare specifice şi constituie matricea proceselor celulare de transport activ de substanţă; ea controlează procesele de intrare a nutrienţilor în celulă şi de eliminare a produşilor neutilizabili, contribuie la generarea şi menţinerea de diferenţe de concentraţii ionice între mediul intracelular şi extracelular, acţionează ca un senzor al semnalelor celulare externe – participând astfel în procesele de comunicare celulară. În cazul celulelor eucariote, existenţa structurilor membranare este extinsă şi la mediul intracelular, constituind un element definitoriu spaţial şi funcţional al unor organe celulare specifice, cum ar fi: mitocondrii, cloroplaste şi lizozomi. Încă din anul 1972, S. J. Singer and G. L. Nicolson au propus (acum) celebrul model '*fluid mosaic*' pentru vizualizarea structurală a biomembranelor. Esenţa acestui model prezentat de cei doi cercetători, este că biomembranele sunt structuri fluide ce se constituie ca un 'solvent' bidimensional pentru proteinele biomembranare. Cu toate că una din caracteristicile definitorii ale celulelor şi organelelor lor este diversitatea funcţională şi structurală, biomembranele au anumite trăsături comune, cum ar fi:

- sunt structuri planare, cu grosimi moleculare între 60 şi 100 Å şi care formează bariere închise în jurul mediilor pe care le individualizează spaţial;
- sunt alcătuite, în principal, din lipide şi proteine;
- proteinele membranare sunt structurile esenţiale implicate în înzestrarea biomembranelor cu funcţii specifice; aceste proteine servesc drept pompe moleculare şi ionice membranare, receptori, enzime, elemente de conversie a energiei;
- sunt suprastructuri moleculare necovalente; starea de energie minimă a structurilor biomembrană-proteine este dată de implicarea cooperativă a interacţiunilor necovalente (cum ar fi forţele van der Waals, interacţiunile electrostatice sau legăturile de hidrogen);
- sunt asimetrice; ele sunt constituite din două membrane suprapuse, iar conţinutul lipidic al fiecărei mono-membrane este individualizat;
- sunt structuri fluide; moleculele lipidice şi proteinele constituente difuzează rapid rotaţional în jurul axei proprii şi în planul membranei. Trebuie reţinut însă că rotaţia lipidelor sau proteinelor în planuri perpendiculare pe planul membranei este aproape absentă. Au fost însă identificate proteine specializate în transferul lipidelor dintr-un monostrat într-altul al unei biomembrane; aceste proteine se numesc '*flippase*', şi pot reduce timpul mediu de translocare al fosfolipidelor de la ~ 10 zile la aproape câteva minute.

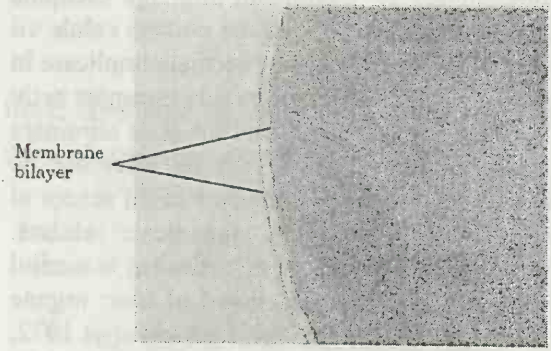


Figura 2 Imagine obținută cu tehnici de microscopie electronică, a unei biomembrane eritrocitare ce a fost în prealabil marcată cu osmium tetroxide. Este de remarcat structura generală de triplu-strat a acestei membrane, formată din două zone mai dense ce delimitează mediul intern al biomembranei, ce are grosimea de 5 – 8 nm (adaptat din *www*). Structural, această membrană se identifică în figură ca un bistrat lipidic (*membrane bilayer*); vezi text.

'Cărămizile' de bază ale alcătuirii membranelor biologice le constituie lipidele. Lipidele sunt molecule insolubile în apă, dar care sunt uşor dizolvate de către solvenți organici. Ele constituie aproximativ 50 % din masa membranelor celulelor animale şi au o densitate superficială de aproximativ 5×10^6 lipide pe 1 μm^2 arie de membrană. Cele mai importante clase de lipide întâlnite în constituirea biomembranelor celulelor eucariote sunt:

- fosfolipidele (cele mai întâlnite);
- colesterolul;
- glicolipidele.

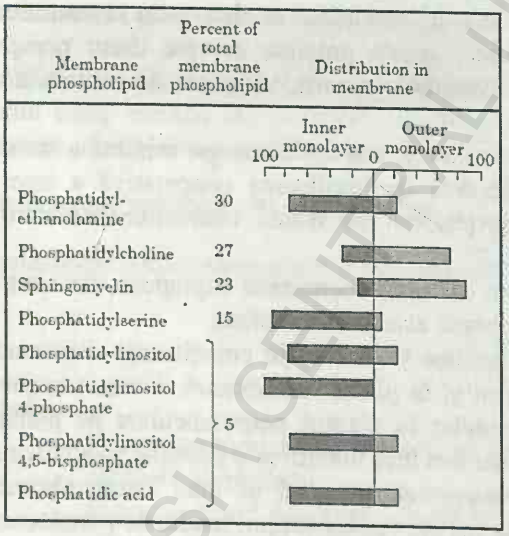


Figura 3 Distribuția relativă a diferitelor tipuri de lipide în monostraturile interne şi, respectiv, externe ale biomembranei eritrocitare (adaptat din D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry,* Fourth Edition, W. H. Freeman, 2004).

Din punct de vedere al compoziției biochimice, lipidele sunt, mai ales, compuşi hidrocarbonați; specific, ele constituie o formă superioară de reducere a atomilor de carbon care, după procesele de oxidare asociate cu metabolismul celular, pot genera cantități mari de energie. Putem aprecia că din punct de vedere biochimic, un alt rol esențial jucat de lipide este cel de molecule macroergice. Caracterul biochimic comun al acestor lipide, factor determinant al modului de auto-organizare a

biomembranelor, este cel de amfifaticitate; altfel spus, lipidele au un capăt structural cu proprietăţi hidrofile şi altul, cu proprietăţi hidrofobe.

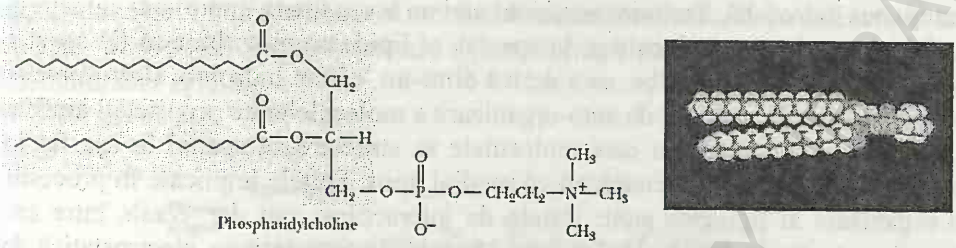


Figura 4 Reprezentarea structurală simplificată a unei molecule lipidice din clasa fosfatidilcolinei.

Cum este reprezentat în Fig. 4, o moleculă tipică fosfolipidică are un capăt polar şi două 'cozi' ('*tails*') hidrofobe hidrocarbonate. Cozile hidrocarbonate diferă în lungime (conţin între 14 şi 24 atomi de carbon), şi pot fi nesaturate (să conţină una sau mai multe legături duble). Lungimea, precum şi caracterul saturat (sau nesaturat) al lipidelor biomembranelor sunt factori ce determină nemijlocit abilitatea lipidelor de a interacţiona între ele, influenţând deci fluiditatea membranelor. Unul din modurile posibile de auto-organizare a moleculelor lipidice într-un mediu apos este cel micelar ('*micelle*'), în care cozile hidrocarbonale ale lipidelor interacţionează între ele, 'evitând' astfel contactul cu moleculele polare de apă. Un alt mod de auto-organizare a lipidelor, care să dea naştere unei structuri cu energie minimă, este de bistrat lipidic ('*bilayer*' – vezi şi Fig. 2); atunci când topologia unui bistrat lipidic este una sferică, se obţine un lipozom ('*liposome*') (Fig. 5).

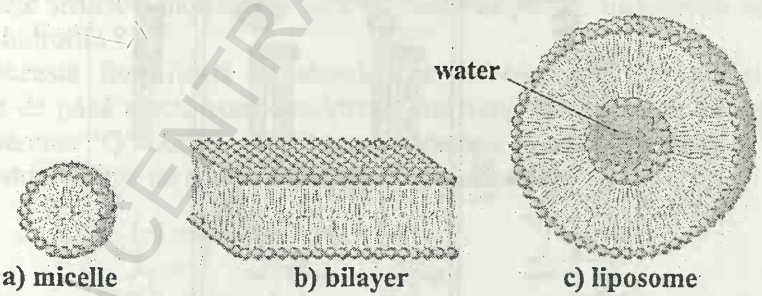


Figura 5 Moduri de organizare spaţială a moleculelor lipidice prezente în medii hidrofile (adaptat din *www*).

Structura de auto-organizare 'favorită' a majorităţii fosfolipidelor şi glicolipidelor într-un mediu apos este de bistrat lipidic, şi nu de micele. Aceasta este o consecinţă ce decurge din considerente de stericitate, deoarece cozile hidrofobe ale acestor lipide au dimensiuni geometrice prea mari pentru a încăpea în interiorul unei structuri micelare, spre deosebire de sărurile unor acizi graşi – ex. palmitat de sodiu – ce sunt ingredienţi de bază ai unor săpunuri, care conţin în coada hidrofobă doar un singur lanţ hidrocarbonat dimensionat corespunzător formării micelelor. Formarea

unui bistrat lipidic este eminamente un proces spontan, de auto-organizare, care apare datorită proprietății intrinseci de amfifaticitate a lipidelor. Cea mai importantă interacțiune ce favorizează organizarea spontană a moleculelor lipidice în bistrat este interacțiunea hidrofobă. Trebuie menționat aici un lucru foarte important: caracterul de hidrofobicitate al unor molecule și, în special, al lipidelor, nu trebuie să fie asociat cu existența unei 'forțe' hidrofobe, care derivă dintr-un 'câmp' hidrofob. Hidrofobicitatea se referă exclusiv la maniera de auto-organizare a moleculelor cu proprietăți amfifatice (în particular a lipidelor), în care moleculele se structurează spațial în așa fel încât cozile hidrocarbonate evită contactul cu mediul apos. Forțele implicate în procesul de auto-organizare al lipidelor sunt: forțele de interacțiune van der Waals între cozile hidrocarbonate (hidrofobe) ale lipidelor, forțele de interacțiune electrostatică între capetele polare ale lipidelor și moleculele de apă și forțele tip 'legătură de hidrogen' între capetele polare și moleculele de apă. Această intercorelare de interacțiuni multiple favorizează fenomenul de hidrofobicitate și mediază formarea bistraturilor lipidice, ca structuri unitare și în stare de energie minimă. Forțele covalente nu sunt implicate în realizarea unei structuri de bistrat lipidic, astfel încât fluiditatea membranară reprezintă una din proprietățile inerente ale biomembranelor.

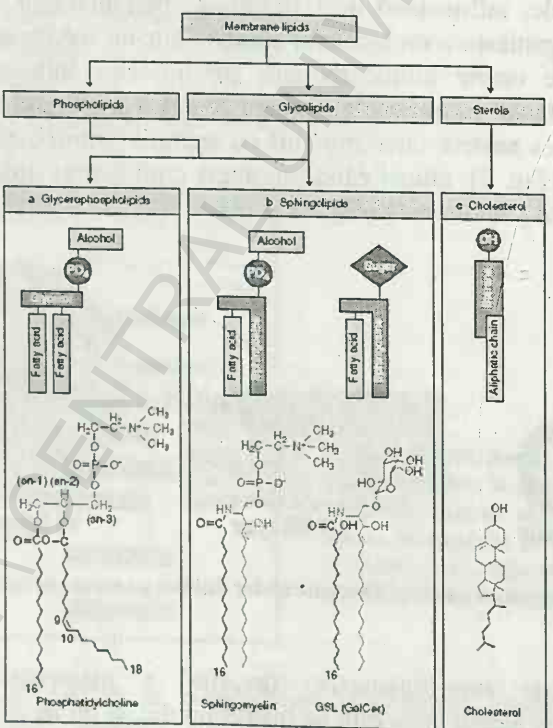


Figura 6 Schema bloc de clasificare a moleculelor lipidice ce intră în compoziția biomembranelor (adaptat din www).

Datorită faptului că regiunea internă a oricărei biomembrane este constituită din grupări chimice C – H, și pentru că electronegativitățile carbonului și, respectiv,

ale hidrogenului sunt aproape egale (2.55 pentru carbon şi 2.2 pentru hidrogen în scala lui Pauling), legăturile covalente între respectivele grupări chimice hidrocarbonate sunt, mai ales, nepolare. Din punct de vedere al polarizabilităţii electrice, spunem aşadar că interiorul hidrocarbonat al oricărei biomembrane este nepolarizabil, şi acest lucru este 'tradus' fizic printr-o valoare a permitivităţii electrice relative a interiorului biomembranelor ε_r (BM) ~ 2.

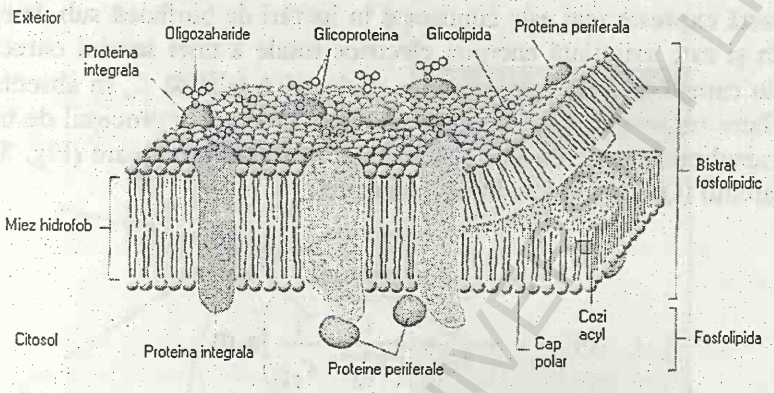


Figura 7 Reprezentarea schematică a constituenţilor moleculari proteici principali ai unei biomembrane: monostraturile lipidice, proteinele integrale, proteinele periferice, glicoproteine, glicolipide, oligozaharide.

Dar, să nu uităm de la ce întrebare iniţială am plecat: de ce nu sunt biomembranele structuri moleculare care să faciliteze *per se* transportul ionilor şi al moleculelor hidrofile ?

În această fază finală de abordare a întrebării de mai sus şi pe baza cunoştinţelor de până acum, vom considera cazul simplificat al unui ion oarecare cu raza 'a' şi sarcina 'Q'. Astfel, densitatea de energie a câmpului electric cauzat de prezenţa acestui ion într-un mediu polarizabil oarecare este:

$$w_e(r) = \frac{1}{2}\varepsilon_0\varepsilon_r E^2(r)$$

deci: (10)

$$w_e(r) = \frac{1}{2}\varepsilon_0\varepsilon_r\left(\frac{Q}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r^2}\right)^2 = \frac{1}{2\varepsilon_0\varepsilon_r}\left(\frac{Q}{4\pi r^2}\right)^2$$

Energia câmpului electric conţinut în pătura sferică mărginită de sferele imaginare cu razele (r) şi (r + dr) măsurate faţă de centrul imaginar al sarcinii 'Q', este dată de:

$$dW_{r,r+dr} = w_e(r)\left(4\pi r^2\right)dr \qquad (11)$$

Prin integrarea relației de mai sus între raza sarcinii (a) și infinit, obținem o expresie pentru valoarea totală a energiei câmpului electric generat de sarcina considerată:

$$W = \frac{Q^2}{8\pi a \varepsilon_0 \varepsilon_r} \tag{12}$$

Această expresie mai este cunoscută în lucrări de biofizică sub denumirea de energie Born și este asimilată energiei electrice totale a unei sarcini oarecare aflate într-un mediu caracterizat de permitivitatea dielectrică relativă ε_r, în absența oricăror interacțiuni între respectiva sarcină și alte câmpuri externe. În procesul de translocare printr-o biomembrană, așa cum este schematizat în figura următoare (Fig. 8), energia electrică a sarcinii (Q, a) se va modifica deci astfel:

$$\Delta W_{b-w} = W_{biomembrane} - W_{water}$$
$$\Delta W_{b-w} = \frac{Q^2}{8\pi\varepsilon_0 a}\left(\frac{1}{\varepsilon_{r2}} - \frac{1}{\varepsilon_{r1}}\right) > 0 \tag{13}$$

Astfel, datorită faptului că mediul intern al biomembranelor ($\varepsilon_{r2} \sim 2$) este mult mai puțin polarizabil decât mediul apos ($\varepsilon_{r1} \sim 80$), variația de energie a câmpului electric pentru sarcina considerată, asociată cu o astfel de tranziție, ar avea valoare pozitivă; acest lucru sugerează un caracter endoenergetic pentru transferul unui ion din apă într-o biomembrană, și deci improbabilitatea ca respectivul ion să tranziteze din apă în biomembrană, în absența unei surse externe de energie.

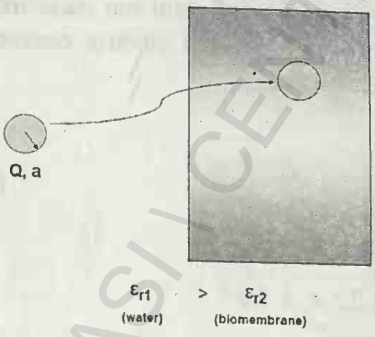


Figura 8 Reprezentarea simplificată a procesului de translocare a unui ion cu sarcina 'Q' și raza 'a' între două medii dielectrice considerate semiinfinite. În oricare din cele două medii, ionul studiat se consideră a fi suficient de îndepărtat de suprafața de separație, încât să putem neglija interacțiunile dintre el și sarcinile electrice de polarizare induse în acea regiune.

Această concluzie răspunde astfel întrebării puse anterior. Suplimentar, raționamentul de mai sus ne indică faptul că s-ar putea să existe o forță de interacțiune între ionul considerat și suprafața de separație dintre mediile apos și, respectiv, biomembranar, ce se manifestă în așa fel încât sarcina noastră să fie respinsă de această suprafață de separație în cursul unui posibil proces de tranziție între cele două medii.

Câteva din întrebările pertinente care ar putea fi puse acum pot fi:

- cum este posibil ca pentru un ion ce tranzitează din mediul apos în cel biomembranar, interfaţa mediu apos – biomembrană să fie privită în termeni simpli, electrici, ca o sarcină electrică echivalentă, întotdeauna cu acelaşi semn ca şi sarcina ionului permeant, rezultând astfel fenomenul de respingere electrostatică menţionat mai sus ?
- care este profilul de variaţie al energiei electrice al unui ion în vecinătatea unei biomembrane, având în vedere existenţa forţelor de interacţiune menţionate mai sus ?

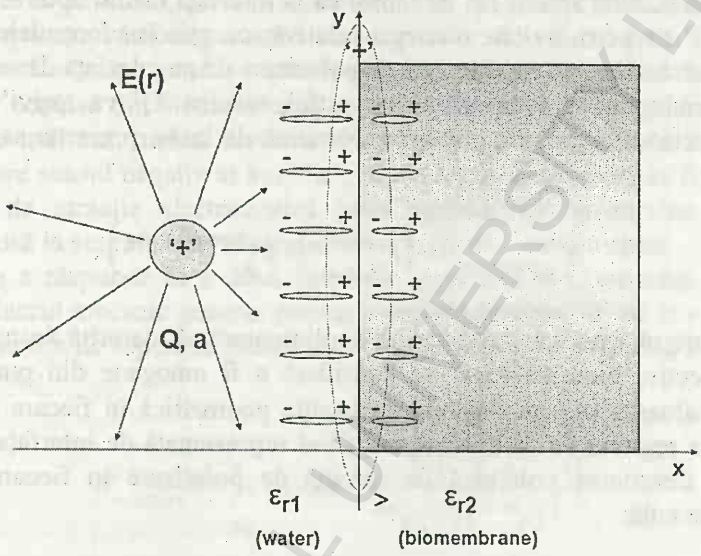


Figura 9 Ilustrarea intuitivă a proceselor de polarizare electrică a interfeţei dintre mediile polarizabile 'apă' (*'water'*) şi 'biomembrană' (*'biomembrane'*), în cursul procesului de deplasare al unui ion dinspre mediul apos spre cel membranar.

Răspunsul fenomenologic la prima întrebare este uşor de dat, dacă avem în vedere faptul că 'bariera' de potenţial este constituită de interfaţa mediu apos – biomembrană, ce separă două medii cu proprietăţi de polarizabilitate electrică diferită. Pentru simplificarea acestui argument, vom presupune că cele două medii sunt semiinfinite (mediul apos $\in \{-\infty$, interfaţă$\}$ iar biomembrana $\in \{$interfaţă, $+\infty\}$) (Fig. 9). După cum vom vedea mai jos, această presupunere este foarte importantă pentru elucidarea contextului fizic în care discutăm despre interacţiunile electrice 'sarcină' – 'interfaţă'. Dacă ne vom concentra raţionamentul asupra unei sarcini electrice pozitive care se mişcă din mediul apos spre cel biomembranar, dat fiind caracterul mai puţin polarizabil al mediului membranar decât al mediului apos, densitatea de sarcină superficială de polarizare la interfaţa mediu apos – biomembrană datorată polarizării (limitate a) domeniilor moleculare hidrocarbonate membranare va fi mai mică decât densitatea de sarcină superficială de polarizare a moleculelor de apă. Aşa după cum precizam şi mai sus, relaţia ce stabileşte legătura dintre proprietăţile dielectrice ale unui mediu polarizabil (ε_r), valoarea normală pe suprafaţa ce mărgineşte acel mediu al vectorului polarizabilitate electrică (P_n) şi valoarea densităţii superficiale de sarcină electrică induse pe acea suprafaţă ($\sigma_{superficial}$) este:

$$\sigma_{\sup erficial} = P_n(r)$$
$$unde: \qquad (14)$$
$$P_n(r) = \varepsilon_0(\varepsilon_r - 1)E_n(r)$$

Ţinând cont de orientarea vectorului câmp electric al sarcinii studiate în acest exemplu (de la sarcină spre ∞) şi de faptul că la interfaţa mediu apos – biomembrană există un 'salt' de permitivitate electrică relativă, cu ajutorul formulelor de mai sus, putem deci concluziona că sarcina netă de polarizare de pe interfaţa de separaţie mediu apos – biomembrană va avea semn '+'; astfel, sarcina 'Q' va 'privi' la respectiva interfaţă o sarcină electrică de polarizare, cauzată de însăşi prezenţa sa şi ce va avea acelaşi semn.

$$\sigma_{\sup erficial} = \left(P_n^{water} - P_n^{biomembrane}\right) \qquad (15)$$

Trebuie să facem aici precizarea suplimentară că, datorită faptului că mediile apos şi, respectiv, biomembranar se consideră a fi omogene din punct de vedere dielectric – valoarea (ε_r) nu depinde de locaţia geometrică în fiecare din cele două medii, singura regiune de discontinuitate fiind reprezentată de interfaţa între mediile respective – densitatea volumică de sarcină de polarizare în fiecare din mediile respective este nulă:

$$\rho_P(water) = -\varepsilon_0\chi_1 div[E_1(r)] = 0$$
$$\rho_P(biomembrane) = -\varepsilon_0\chi_2 div[E_2(r)] = 0 \qquad (16)$$

unde χ_1 şi χ_2 sunt susceptivităţile electrice ale apei şi, respectiv, ale biomembranei, iar $E_1(r)$ şi $E_2(r)$ sunt intensităţile câmpului electric în apă şi biomembrană, iar în prima din aceste relaţii, intensitatea câmpului electric $E_1(r)$ este estimată în afara volumului conţinut de sarcina 'Q'.

Continuând raţionamentul, atunci când sarcina 'Q' se mişcă spre interfaţa de separaţie mediu apos – biomembrană, ea va interacţiona electrostatic cu o sarcină electrică de acelaşi semn şi, deci, această mişcare poate avea loc doar cu efectuarea unui lucru mecanic din exterior asupra sarcinii respective. Cititorul poate verifica că aceeaşi concluzie este validă şi pentru situaţia unei sarcini electrice negative. Fără a intra în detalii matematice – cititorul este încurajat să consulte un tratat de electrodinamică clasică – spunem doar că forţa de interacţiune dintre sarcina 'Q' şi sarcina electrică de polarizare indusă la suprafaţa de separaţie mediu apos – biomembrană aflată la distanţa 'x' faţă de centrul sarcinii 'Q', unde ambele medii se consideră a fi semi-infinite, este dată de expresia:

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$F(x) = -\frac{\varepsilon_{r2} - \varepsilon_{r1}}{\varepsilon_{r2} + \varepsilon_{r1}} \frac{Q^2}{4\varepsilon_{r2} x^2} \tag{17}$$

Semnificaţia semnului '-' din formula de mai sus este simplă, şi în corespondenţă logică cu ce am expus mai sus: dacă în mişcarea sa, sarcina 'Q 'priveşte' un mediu al cărui permitivitate electrică relativă este mai mică decât a mediului din care ea vine ($\varepsilon_{r2} < \varepsilon_{r1}$), sensul forţei de interacţiune dintre sarcină şi suprafaţa de separaţie va fi dispus spre sensul pozitiv al axei 'x' (vezi Fig. 9) şi deci aceasta sugerează o 'respingere' a suprafeţei de separaţie de către sarcina Q. Dacă însă sarcina Q s-ar deplasa din biomembrană spre mediul apos ($\varepsilon_{r2} > \varepsilon_{r1}$), în conformitate cu formula de mai sus, sensul forţei de interacţiune între suprafaţa de separaţie şi sarcină este spre sensul negativ al axei 'x'; în acest caz, deplasarea ar fi favorizată de interacţiunile de atracţie electrostatică între sarcina 'Q' şi sarcina electrică de polarizare indusă la suprafaţa de separaţie biomembrană – mediu apos.

Pentru a răspunde la a doua întrebare pusă mai sus, utilizăm formula (17) pentru a găsi lucrul mecanic necesar pentru a deplasa sarcina 'Q' de la – ∞ la distanţa 'r' faţă de suprafaţa de separaţie mediu apos – biomembrană, măsurată în mediul apos în lungul axei 'x':

$$W_{-\infty,r} = \int_{-\infty}^{r} -F(x)dx = \frac{\varepsilon_{r1} - \varepsilon_{r2}}{4\varepsilon_{r2}\left(\varepsilon_{r1} + \varepsilon_{r2}\right)} \frac{Q^2}{r} \tag{18}$$

Aceast termen poate fi interpretat ca fiind energia consumată din exterior pentru polarizarea interfeţei de separaţie mediu apos – biomembrană, prin aducerea sarcinii 'Q' de la – ∞ la distanţa 'r' faţă de suprafaţa respectivă.

Din analiza formulelor de mai sus, se vede că pentru $x \to \infty$, $F(\infty) \to 0$; acest rezultat are sens fizic, deoarece în acest caz, intensitatea câmpului electric al sarcinii 'Q' care ar putea să polarizeze net interfaţa dintre cele două medii este nulă. De asemenea, dacă cele două medii sunt identice ($\varepsilon_{r2} = \varepsilon_{r1}$), $F(x) = 0$; în acest caz, nu se va produce o polarizare preferenţială a respectivei interfeţe şi, deci, valoarea densităţii superficiale de sarcină electrică pe suprafaţa considerată va fi nulă.

Pentru a determina însă profilul de energie electrică al sarcinii 'Q' în mediul intern al unei biomembrane cu grosime finită ('d'), la o distanţă oarecare ('x') de una din suprafeţele sale de separaţie cu mediul apos, vom utiliza un alt raţionament. La – ∞, unde interacţiunea cu sarcinile electrice de polarizare induse pe interfeţele de separaţie mediu apos – biomembrană este nulă, energia sarcinii 'Q' este dată de :

$$E_{water} = W_{water} \tag{19}$$

unde W_{water} este energia Born a sarcinii 'Q' în mediul apos.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În mediul biomembranar, la distanța 'x' față de una din interfețe (Fig. 10), energia de interacție dintre sarcina 'Q' și sarcinile electrice de polarizare induse este diferită de zero și deci energia electrică totală a sarcinii 'Q' este dată de :

$$E_{biomembrane} = W_{biomembrane} + \delta_{biomembrane}(x) \qquad (20)$$

unde $W_{biomembrane}$ este energia Born a sarcinii 'Q' în mediul biomembranei, iar $\delta_{biomembrane}(x)$ este termenul energetic dat de interacțiunile între sarcina 'Q' aflată în biomembrană la distanța 'x' și sarcinile induse de ea pe ambele interfețe ale biomembranei.

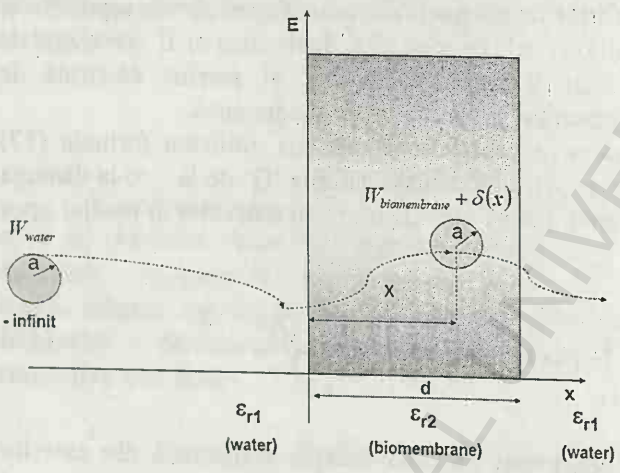


Figura 10 Reprezentarea schematizată a mișcării unei sarcini 'Q' aflată inițial într-un mediu apos, la $-\infty$, în interiorul hidrofob al unei biomembrane, la distanța 'x' de interfața stânga a acesteia. Mediul intern biomembranar se consideră a avea grosime finită ('d').

Cu aceste relații, putem aprecia că variația de energie electrică totală a sarcinii 'Q' atunci când ea este deplasată de la $-\infty$ la distanța 'x' în interiorul biomembranei (Fig. 10) este dată de:

$$\Delta E_{biomembrane-water}(x) = \Delta W_{b-w} + \delta_{biomembrane}(x) \qquad (21)$$

unde ΔW_{b-w} este variația energiei Born a sarcinii 'Q' între mediile apos ('*water*') și, respective, biomembranar ('*biomembrane*').

În expresiile de mai sus, termenul $\delta_{biomembrane}(x)$ se demonstrează a avea următoarea expresie analitică:

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\delta_{biomembrane}(x) = -\frac{Q^2 \vartheta}{16\pi\varepsilon_0 \varepsilon_{r2} d}\left\{\frac{1}{x}+\frac{1}{d}\sum_{n=1}^{\infty}\left[\frac{\vartheta^{2n}}{\left(n+\frac{x}{d}\right)}+\frac{\vartheta^{2n-2}}{\left(n-\frac{x}{d}\right)}-\frac{\vartheta^{2n}}{\left(n+\frac{a}{d}\right)}-\frac{\vartheta^{2n-2}}{\left(n-\frac{a}{d}\right)}\right]\right\} \quad (22)$$

unde:

$$\vartheta = \frac{\varepsilon_{r1}-\varepsilon_{r2}}{\varepsilon_{r1}+\varepsilon_{r2}}$$

Este deosebit de important ca cititorul să nu facă confuzie în utilizarea pentru termenul '$\delta_{biomembrane}$' a valorii deduse anterior pentru lucrul mecanic necesar pentru a deplasa sarcina 'Q' de la $-\infty$ la distanţa 'r' faţă de suprafaţa de separaţie mediu apos – biomembrană $W_{-\infty,r}$ (relaţia 18). În deducerea acelei valori, am presupus că mediile apos şi membranar sunt semiinifinite, şi deci interacţiile electrostatice aveau loc între sarcina 'Q' şi sarcina electrică indusă pe suprafaţa de separaţie (interacţiune 'sarcină' – 'sarcină'). În cazul unei biomembrane reale, cu grosime finită, prezenţa sarcinii 'Q' în vecinătatea ei conduce la apariţia unor densităţi superficiale de sarcină pe cele două interfeţe de separaţie între ea şi mediul apos; aşadar, interacţiunile electrice ce fundamentează fizic termenul '$\delta_{biomembrane}$', în acest caz, sunt de tip 'sarcină' – 'sarcini dipolare induse' pe ambele suprafeţe de separaţie. Doar pentru exemplificare, într-un spaţiu caracterizat de ε_{r1} şi în care există câmp electric uniform orientat pe axa 'x' (E_x), o sferă dielectrică cu raza 'a' şi permitivitate electrică relativă ε_{r2} va putea fi reprezentată electric, datorită fenomenului de polarizare electrică indusă pe întreaga sa suprafaţă, ca un macro-dipol cu momentul dipolar (Fig. 11) :

$$p = E_x a^3 \frac{\varepsilon_{r2}-\varepsilon_{r1}}{\varepsilon_{r2}+2\varepsilon_{r1}} \quad (23)$$

Această expresie a fost dedusă prin aplicarea ecuaţiei lui Poisson pentru mediul extern sferei, împreună cu luarea în consideraţie a condiţiilor la limită pe suprafaţa de separaţie între sferă şi mediul extern pentru componentele deplasării electrice în cele două medii, exprimate într-un sistem de coordonate polare, cu originea în centrul sferei. Din expresia de mai sus, se poate deduce expresia polarizabilităţii sferei, utilizând relaţia sa de definiţie :

$$P = \frac{p}{V} = \frac{3}{4\pi a^3} p = \frac{3}{4\pi} E_x \frac{\varepsilon_{r2}-\varepsilon_{r1}}{\varepsilon_{r2}+2\varepsilon_{r1}} \quad (24)$$

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

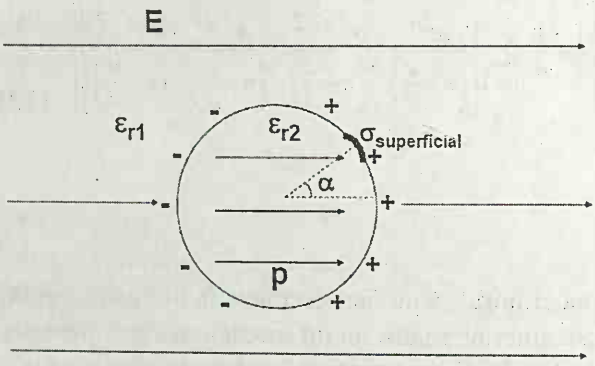


Figura 11 Polarizarea diferențiată a unei sfere dielectrice cu raza 'a' într-un câmp electric uniform.

Utilizând relațiile de mai sus între polarizabilitate (efect) şi câmpul electric extern (cauză), deducem expresia pentru densitatea superficială de sarcină indusă pe suprafața externă a sferei:

$$\sigma_{\sup erficial} = 3\varepsilon_0 E_x \cos(\alpha)\frac{\varepsilon_{r2} - \varepsilon_{r1}}{\varepsilon_{r2} + 2\varepsilon_{r1}} \qquad (25)$$

Un alt exemplu este dat de situația unui dielectric planar ce are permitivitatea electrică relativă ε_{r2} şi care se află într-un mediu oarecare ε_{r1}, în care există un câmp electric uniform (E_x) perpendicular pe acest dielectric (Fig. 12). Aplicând condițiile de trecere ale componentei normale la suprafața de separație a vectorului deplasare electrică la interfețele de separație dielectric – mediu extern, putem scrie:

$$\begin{aligned} D_x^1 &= D_x^2 \\ \varepsilon_0\varepsilon_{r1}E_x^1 &= \varepsilon_0\varepsilon_{r2}E_x^2 \\ E_x^2 &= \frac{\varepsilon_{r1}E_x^1}{\varepsilon_{r2}} \end{aligned} \qquad (26)$$

unde E_x^1 şi, respectiv, E_x^2 reprezintă intensitățile câmpului electric pe direcția axei 'x' în afara dielectricului şi în interiorul său.

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

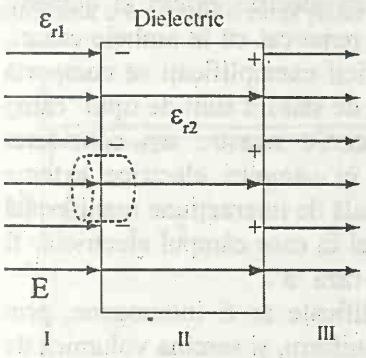


Figura 12 Polarizarea diferenţiată a unui dielectric planar dispus într-un câmp electric uniform; mediul 'II' este asociat cu interiorul domeniului dielectric, a cărui permitivitate electrică relativă este notată cu ε_{r2}.

Din definiţiile anterioare, ştim că densităţile superficiale nete de sarcini induse pe cele două suprafeţe de separaţie ale biomembranei faţă de mediul apos sunt date de :

$$\sigma_{superficial} = \pm\left(P_n^1 - P_n^2\right) \tag{27}$$

unde valorile normale ale polarizabilităţilor electrice pe suprafeţele de separaţie ale dielectricului cu mediul extern sunt date de:

$$\begin{aligned} P_n^{\,1} &= \varepsilon_0\left(1-\varepsilon_{r1}\right)E_x^1 \\ P_n^{\,2} &= \varepsilon_0\left(1-\varepsilon_{r2}\right)E_x^2 \end{aligned} \tag{28}$$

În aceste condiţii, valoarea densităţii superficiale de sarcini induse devine :

$$\sigma_{superficial} = \varepsilon_0\left(1-\varepsilon_{r1}\right)E_x^1 - \varepsilon_0\left(1-\varepsilon_{r2}\right)\frac{\varepsilon_{r1}E_x^1}{\varepsilon_{r2}} \tag{29}$$

sau:

$$\sigma_{superficial} = \pm\varepsilon_0 E_x^1\left(\frac{\varepsilon_{r1}}{\varepsilon_{r2}} - 1\right) \tag{30}$$

În cazul particular în care mediul dielectric considerat are permitivitatea electrică relativă identică cu a mediului extern ($\varepsilon_{r1} = \varepsilon_{r2}$), se poate verifica uşor că în aceste două exemple discutate, densitatea de sarcină superficială indusă are valoare nulă – aşa cum ar fi de aşteptat. Pentru $\varepsilon_{r1} \neq \varepsilon_{r2}$ însă, regiunea dielectrică se comportă ca un macro-dipol cu orientarea aşa cum este indicată în figura de mai sus, iar densităţile de sarcină electrică superficială indusă sunt date de formula precedentă.

UMF IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aceste ultime două exemple discutate se doresc a fi doar exemplificări punctuale ale tipurilor de interacțiuni ce se pot stabili între un câmp electric extern și domenii dielectrice finite, cu geometrii diferite; este esențial de remarcat că în ambele cazuri, datorită sarcinilor electrice superficiale induse, dielectricii exemplificați se comportă electric ca macrodipoli și interacțiunile electrice posibil de stabilit sunt de tipul 'câmp electric extern' – 'dipol'. Totuși, deoarece în deducerile noastre am considerat exemplul unor domenii dielectrice omogene plasate în câmpuri electrice externe uniforme orientate pe axa 'x', trebuie reținut că forța totală de interacțiune manifestată în aceste sisteme este nulă. Evident, nu acesta este cazul în care câmpul electric ar fi generat de o sarcină electrică 'Q' modelată ca o sferă cu raza 'a'.

În cazul în care domeniile dielectrice exemplificate ar fi inomogene, prin intermediul interacțiunii dintre câmpul electric extern, uniform, și sarcina volumică de polarizare diferită de zero a cărei densitate este dată de ($\rho_{volume}(x) = -div[P(x)] = -\varepsilon_0 div\left\{\left[1-\varepsilon_{r2}(x)\right]E_x^1\right\}$), s-ar putea 'simți' existența unei forțe nete diferite de zero ce acționează asupra domeniului dielectric considerat. Într-o exprimare matematică succintă, densitatea volumică de forță electrică $f_e(r)$ ce se exercită într-un dielectric inomogen ($\varepsilon = \varepsilon(r)$) care se află într-un câmp electric E(r) variabil în spațiu este dată de expresia:

$$f_e(r) = -\frac{1}{2}E^2(r)grad[\varepsilon(r)] + \frac{1}{2}grad\left[\rho_m \frac{\partial \varepsilon}{\partial \rho_m}E^2(r)\right] \qquad (31)$$

unde ρ_m este densitatea masică a dielectricului considerat.

Termenul ($-\frac{1}{2}E^2(r)grad[\varepsilon(r)]$) din partea dreaptă a expresiei (31) este asociat cu interacțiunile ce se exercită între un dielectric inomogen și un câmp electric extern, ce poate fi chiar și omogen, datorită inducerii în volumul dielectricului a unei densități de sarcină de polarizare diferită de zero. Termenul ($\frac{1}{2}grad\left[\rho_m \frac{\partial \varepsilon}{\partial \rho_m}E^2(r)\right]$) este asociat fenomenului de electrostricțiune, în care un câmp electric inomogen în spațiu induce deformări volumice ale unui dielectric – ce poate fi chiar și omogen – din vecinătatea sa, prin intermediul interacțiunilor dipoli induși – câmp electric extern; în acest caz, dipolii induși sunt asociați cu densitatea superficială de sarcină de polarizare.

Cu relevanța specifică pentru cazul geometriei biomembranei considerate, în figura de mai jos (Fig. 13) am reprezentat profilul de variație al cantității $\delta_{biomembrane}(x)$, pentru cazul în care grosimea (d) a membranei și sarcina ionului au fost considerate egale cu unitatea, raza (a) ionului a fost considerată egală cu 0.0001 – unități relative

la grosimea membranei, $\varepsilon_{r1} = 80$, iar $\varepsilon_{r2} = 2$ şi 10. Pentru a fi eficienţi în evaluare, sumarea s-a efectuat doar până la termenul '100' (vezi relaţia 22).

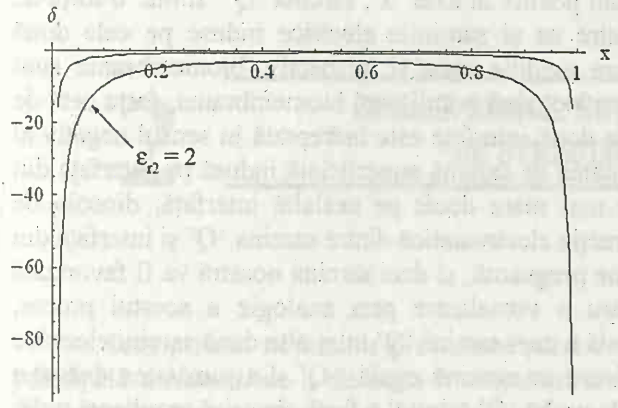


Figura 13 Reprezentare grafică a profilului de variaţie al cantităţii $\delta_{biomembrane}(x)$, pentru cazul în care grosimea (d) a membranei şi sarcina ionului au fost considerate egale cu unitatea, raza (a) ionului a fost considerată egală cu 0.0001 – unităţi relative la grosimea membranei, $\varepsilon_{r1} = 80$ iar $\varepsilon_{r2} = 2$ şi 10. Se observă că în cazul în care ε_{r2} se modifică în sens crescător, energia de interacţiune $\delta_{biomembrane}(x)$ scade simţitor, fapt ce conduce la facilitarea transferului ionic prin biomembrana studiată.

După cum se observă din Fig. 13, bariera energetică 'simţită' de ionul 'Q' în încercarea de a traversa biomembrana are o formă aproximativ trapezoidală, şi variaţia maximă de energie electrostatică are loc în vecinătatea celor două interfeţe. În regiunea centrală a biomembranei, ionul s-ar afla într-o relativă stare de echilibru energetic. Aşa după cum vom prezenta şi mai jos, mişcarea sarcinii 'Q' în sensul pozitiv al axei 'x' este endoenergetică în vecinătatea interfeţei din partea stângă a biomembranei şi exoenergetică în vecinătatea celeilalte interfeţe. Pentru a elimina orice sursă de confuzie, facem o precizare importantă că pentru biomembrana discutată de noi, am neglijat alte surse de interacţiune ion – biomembrană, cum ar fi potenţialul de dipol membranar dat mai ales de proprietăţile electrice ale capetelor hidrofile ale lipidelor şi de moleculele de apă parţial-ordonate la interfeţele soluţie apoasă – biomembrană. Astfel, profilul energetic de mai sus nu include alţi termeni decât cei ce se referă la interacţiunile sarcină – dielectric şi care sunt reprezentaţi de densitatea de sarcină superficială induse la interfeţele soluţie apoasă – biomembrană (vezi mai sus).

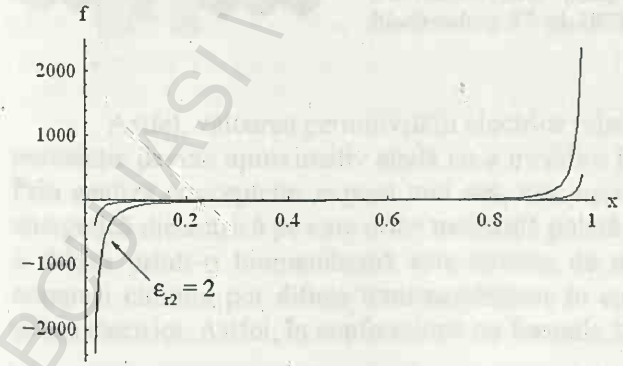


Figura 14 Reprezentarea grafică a forţei de interacţiune ce se exercită între sarcina 'Q' situată în interiorul biomembranei şi sarcina electrică indusă, echivalentă, de pe cele două interfeţe ale biomembranei (vezi formula 22); grosimea membranei şi sarcina ionului au fost considerate egale cu unitatea, raza (a) ionului a fost considerată egală cu 0.0001 – unităţi relative la grosimea membranei, $\varepsilon_{r1} = 80$ iar $\varepsilon_{r2} = 2$ şi 10.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

În figura de mai sus (Fig. 14), semnificația fizică a modificării de semn a forței de interacțiune exercitată între sarcina 'Q' din interiorul biomembranei și sarcina electrică indusă, echivalentă, de pe cele două interfețe ale biomembranei, este ușor de înțeles. Astfel, în mișcarea sa în sensul pozitiv al axei 'x', sarcina 'Q' 'simte' o forță de atracție electrostatică manifestată între ea și sarcinile electrice induse pe cele două interfețe. În cazul considerat, în care mediile apos și, respectiv, biomembranar sunt omogene electric și când mișcarea are loc până la mijlocul biomembranei, forța netă de interacțiune dintre sarcina 'Q' și cele două interfețe este îndreptată în sensul negativ al axei 'x', în principal, deoarece densitatea de sarcină superficială indusă pe interfața din partea stângă a biomembranei este mai mare decât pe cealaltă interfață; dincolo de jumătatea biomembranei, forța de atracție electrostatică dintre sarcina 'Q' și interfața din partea dreaptă a biomembranei devine pregnantă, și deci sarcina noastră va fi favorizată în mișcarea ei în acest sens. Pentru o vizualizare prin analogie a acestui proces, imaginați-vă mișcarea unidimensională a unei sarcini 'Q' între alte două sarcini electrice imobile, considerate pentru simplificare cu sarcină egală '-Q'. La jumătatea distanței între cele două sarcini '-Q', sarcina de probă 'Q' 'simte' o forță electrică rezultantă nulă; lăsată liberă în jurul acestui punct în care câmpul electric rezultant creat de cele două sarcini fixe '-Q' este nul, sarcina de probă '-Q' se va mișca spre una din cele două sarcini fixe, deoarece sensul câmpului electric rezultant variază.

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2 CANALE IONICE: NOŢIUNI FUNDAMENTALE DE STRUCTURĂ ŞI FUNCŢIE

Prin prisma noţiunilor prezentate până acum, putem deci înţelege motivaţia principală a *Naturii* de a dezvolta în decursul unor milioane de ani de evoluţie pori apoşi transmembranari care să faciliteze difuzia ionilor şi a moleculelor polare prin membranele biologice. Într-o reprezentare artistică, porii transmembranari apoşi ce facilitează transportul ionilor şi al moleculelor hidrofile pot fi imaginaţi ca în Fig. 15. Aceşti pori sunt molecule proteice extrem de complexe structural şi funcţional, care odată inserate în biomembrane, conduc la realizarea unor 'găuri' transmembranare. Datorită diametrelor lor relativ mari şi împreună cu caracterul lor parţial polar, se îndeplinesc condiţiile energetice şi entropice optime pentru ca moleculele de apă din mediile intra- şi extracelular să 'umple' aceste 'găuri'.

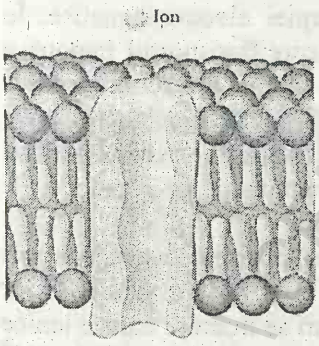


Figura 15 Mod de vizualizare ultra-simplificat al unui por transmembranar (adaptat din R. Garrett, C. M. Grisham, *Biochemistry* 3rd ed, 2005).

Astfel, valoarea permitivităţii electrice relative a acestei (posibile) căi fizice de permeaţie devine aproximativ egală cu a mediilor în care biomembrana este imersată. Prin analiza conceptelor expuse mai sus, este uşor de înţeles că, în acest fel, bariera energetică dielectrică pe care orice moleculă polară sau ion trebuie să o străbată pentru a difuza printr-o biomembrană este extrem de mult diminuată, şi deci respectivii compuşi chimici pot difuza transmembranar în condiţii optime de gradienţi chimici şi/sau electrici. Astfel, în conformitate cu formula 22:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\varepsilon_{r2} \to \varepsilon_{r1}$$
$$\delta_{biomembrane}(x) \to 0 \qquad (32)$$

Aşa după cum vom prezenta şi în paragrafele ce urmează, porii transmembranari celulari au particularităţi structurale şi funcţionale cu mult mai complexe decât este sugerat de figura anterioară; deşi conceptul de 'por transmembranar' a fost prezentat până aici ultra-simplificat, cititorul nu trebuie să fie indus în eroare, şi să creadă că aceste structuri sunt simple 'găuri' sau 'goluri' transmembranare. Cu aportul nemijlocit al acestor structuri macromoleculare de pori transmembranari, se pot distinge următoarele categorii de transport transmembranar:

1. transportul pasiv, în virtutea gradientului electrochimic, al unor ioni sau molecule hidrofile. În cadrul acestui tip de transport, se întâlnesc două clase mari de proteine distincte implicate în desfăşurarea sa: a) '*carriers*' – care interacţionează stereospecific cu molecula transportată, iar proprietăţile cinetice ale acestui tip de transport sunt asemănătoare cu ale unui proces enzimatic; b) canale ionice – sunt formate din structuri de tip 'α *helix*' sau 'β *sheet*', facilitează transportul ionic cu rate foarte mari, apropiate de cele ale difuziei libere în apă, nu prezintă caracter de stereospecificitate şi, în general, fluxul mediat nu este saturabil de concentraţii mari de ioni transportaţi;

2. transportul activ, împotriva gradientului electrochimic al unor ioni sau molecule hidrofile; caracteristic acestui proces este faptul că desfăşurarea sa necesită un aport extern de energie ce poate să provină din scindarea exoenergetică a ATP-ului (Fig. 17), procese de oxidare chimică sau absorbţia energiei electromagnetice. În această categorie, deosebim: a) transport activ primar, în care transportul împotriva gradientului electrochimic este cuplat direct cu absorbţia de energie din surse specifice (vezi Fig. 16); b) transport activ secundar, în care transportul molecular sau ionic împotriva gradientului electrochimic este cuplat direct cu transportul exoenergetic al altor ioni care iniţial au fost acumulaţi într-o parte a biomembranei prin procese de transport activ primar împotriva gradientului lor electrochimic.

În această carte, vom face referiri, mai ales, la o clasă aparte de asemenea pori transmembranari ce permit difuzia ionilor şi a moleculelor, în virtutea gradientului lor electrochimic; generic, în literatura de specialitate, aceşti pori se numesc canale ionice şi porine. Canalele ionice permit transportul ionilor cu rate cuprinse între $10^6 - 10^8$ ioni/sec., ceea ce dă naştere la curenţi ionici individuali (mediaţi de un singur canal ionic) de ordinul $10^{-12} - 10^{-10}$ amperi.

BCU IAŞI CAROL I UNIVERSITY LIBRARY

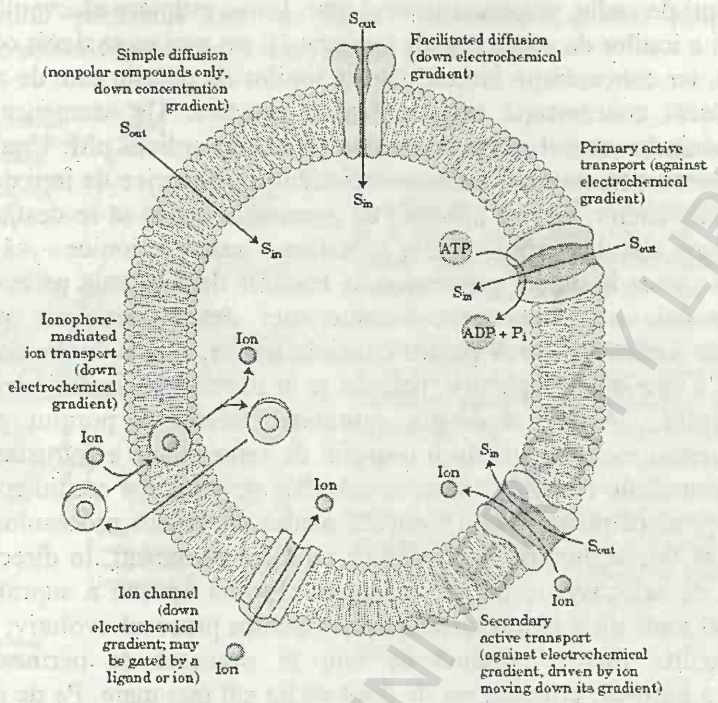


Figura 16 Clasificarea grafică generală a tipurilor de transport ionic facilitate de porii apoşi transmembranari (vezi text) (adaptat din D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry,* Fourth Edition, W. H. Freeman, 2004).

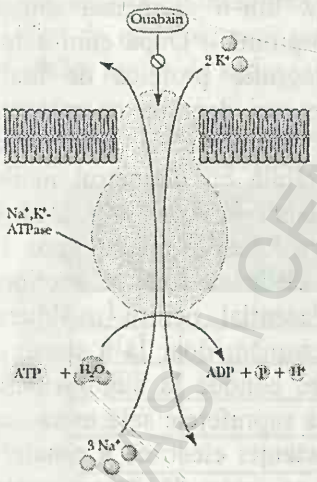


Figura 17 Diagrama simplificată a proteinei Na^+-K^+-ATP-aza ce facilitează transportul activ, împotriva gradientului electrochimic, al ionilor de potasiu spre mediul intracelular şi, respectiv, al ionilor de sodiu spre mediul extracelular. Hidroliza exoenergetică a moleculelor de ATP are loc în mediul intracelular, iar parte din energia eliberată în cursul reacţiei de hidroliză este utilizată pentru transferul a 3 ioni de sodiu şi 2 ioni de potasiu pentru fiecare moleculă de ATP hidrolizată. Inhibitori specifici (e.g., oabaina) interacţionează cu partea extracelulară a acestei proteine, inducând astfel diminuarea dramatică a fenomenelor de transport enunţate (adaptat din *www*).

Aceşti curenţi electrici individuali sunt suficient de mari pentru a produce schimbări rapide ale diferenţei de potenţial transmembranar şi să se constituie, astfel, în substratul fizic al comunicării electrice celulare, prin intermediul potenţialelor de acţiune propagabile. Aspectele fiziologice normale ale celulelor vii sunt condiţionate de existenţa şi menţinerea unor gradienţi de concentraţie pentru specii ionice esenţiale,

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARY LIBRARY

cum ar fi: ionii de sodiu, potasiu, calciu şi clor. Într-o estimare elocventă, concentraţia extracelulară a ionilor de sodiu este de aproape 10 ori mai mare decât concentraţia lor intracelulară, iar concentraţia intracelulară a ionilor de potasiu este de aproape 30 ori mai mare decât concentraţia extracelulară a acestora. De asemenea, concentraţia ionilor de calciu în mediul intracelular este (doar) de ordinul pM. Una din condiţiile esenţiale pentru existenţa unor asemenea distribuţii asimetrice de ioni de o parte şi de alta a biomembranelor, este ca procesul de permeaţie ionică să se desfăşoare selectiv, şi deci proteine membranare integrale specifice – canalele ionice – să distingă între aceste specii ionice în cursul proceselor de transfer de substanţă pe care le mediază. Două dintre cele mai importante caracteristici determinante ale proprietăţii de permeabilitate ionică selectivă pentru canalele ionice, rezidă în forma topologică a porului apos a proteinei respective, precum şi în distribuţia sarcinii electrice fixe din interiorul porului. Astfel, topologia suprafeţei interne a porului permeant este importantă pentru modularea valorii energiei de interacţiune electrostatică între ionii permeanţi şi sarcinile electrice induse la interfaţa de separaţie mediu apos – proteină; sarcina fixă proteică poate deveni esenţială pentru energetica procesului de permeaţie ionică datorită interacţiunilor electrostatice cu ionii permeanţi. În directa legătură cu proprietatea de selectivitate ionică, 'alegerea' formei optime a suprafeţei interne a oricărui canal ionic nu a fost o sarcină uşoară pentru procesul evolutiv; pe de o parte, pentru a facilita fluxuri maxime de ioni în procesul de permeaţie, secţiunea transversală a porului permeant era de dorit să fie cât mai mare. Pe de altă parte însă, proprietatea de 'selectivitate ionică' a canalelor ionice manifestată, în mod remarcabil, şi în cazul ionilor cu sarcina electrică identică, nu poate fi realizabilă fizic decât dacă diametrul echivalent al profilului geometric transversal al porului permeant este comparabil cu diametrele ionilor permeabili dehidrataţi. Într-o asemenea situaţie 'ingrată', până şi *Natura* a trebuit să recurgă la un 'compromis'. După cum a fost demonstrat relativ recent prin experimente de cristalografie proteică de înaltă rezoluţie, secţiunea transversală a porilor permeanţi este mai degrabă ne-uniformă (Fig. 18). Regiunea din porul permeant unde au loc procesele de selectivitate energetică a ionilor difuzanţi este mai îngustă, comparabilă cu diametrul ionilor dehidrataţi respectivi, iar restul porului permeant este suficient de voluminos, încât să permită influxul de ioni hidrataţi cu rate apropiate de ale difuziei în mediul apos. Pe lângă aceste caracteristici fizice, distribuţia de sarcină electrică fixă în interiorul porului permeant rămâne un parametru suplimentar, esenţial pentru modularea fluxurilor ionice prin canale ionice. În acest sens, ne rezumăm doar la a spune că interacţiuni favorabile energetic cu anumite specii ionice conduc la augumentarea concentraţiei acestora din interiorul porului permeant şi la suprafeţele sale extra- sau intracelulare, fapt ce se materializează în mărirea conductanţei electrice a canalului ionic pentru respectiva specie ionică; evident, situaţia se întâmplă invers pentru celelalte specii ionice ce nu interacţionează electrostatic favorabil cu distribuţia de sarcină electrică fixă. În capitole ulterioare, vom deduce analitic forma de variaţie a fluxului de ioni permeanţi prin canale ionice, în funcţie de concentraţia locală a ionilor la capetele porului. Un alt fenomen fizic în care distribuţia de sarcină electrică fixă în

interiorul porului permeant este un factor determinant pentru proprietăţile de conducţie, este selectivitatea ionică între anioni şi cationi.

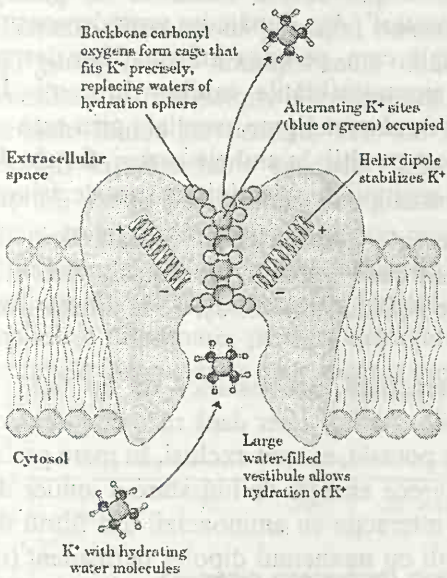


Figura 18 Schema structurală funcţională a unui canal ionic de potasiu, ce surprinde trăsăturile esenţiale ce concură la transportul ionic eficient al acestora prin biomembrane. În funcţie de sensul gradientului electrochimic, un ion de potasiu poate pătrunde în 'anticamera' ('*vestibule*') canalului ionic ce este suficient de voluminoasă încât să permită prezenţa hidratată a ionului. În această locaţie, ionul de potasiu este stabilizat energetic de orientarea optimă a unor regiuni de tip 'α *helix*' din structura canalului ionic ('*helix dipoles*'). Procesul de selectivitate ionică are loc în interiorul unui filtru de selectivitate, ce este compus din atomi de oxigen ai unor grupări specifice carbonil, ce facilitează transferul ionilor de potasiu în stare dehidratată (adaptat din D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition, W. H. Freeman, 2004).

Nomenclatura canalelor ionice se stabileşte în funcţie de tipul ionilor pentru care ele au permeabilitate maximă în condiţii fiziologice normale. Trebuie reţinut însă că, de exemplu, chiar dacă un canal de sodiu este permeabil, mai ales, pentru ionii de sodiu, aceasta nu înseamnă că alţi ioni sunt total excluşi de la difuzia mediată de el. În tabelul de mai jos, sunt prezentate pentru exemplificare permeabilităţile relative ale canalelor ionice de sodiu şi potasiu pentru alţi ioni fiziologici.

Tabel 1 Permeabilităţile relative ale canalelor ionice de sodiu şi potasiu pentru câţiva dintre cei mai importanţi ioni în procesele biofizice.

ION	CANAL DE Na^+ (PERMEABILITATE RELATIVĂ)	CANAL DE K^+ (PERMEABILITATE RELATIVĂ)
Li^+	0.93	<0.01
Na^+	1	<0.01
K^+	0.09	1
Rb^+	< 0.01	0.91
Cs^+	<0.01	<0.08
NH_4^+	0.16	0.14

Pentru a se aprecia cantitativ proprietatea de selectivitate a canalelor ionice pentru diferiţi ioni, cea mai des utilizată metodă – pe care o vom discuta într-un capitol ulterior – este de trasare a diagramelor curent-tensiune ce caracterizează procesele de transport ionic prin membrană, în condiţiile în care în mediile intra- şi extracelular se află ionii de studiu având concentraţii diferite, măsurabile. Din analiza

respectivei diagrame, se poate determina punctul de intersecție al respectivului grafic cu axa 'x', care definește diferența de potențial ($V_{eq.}$) ce trebuie aplicată din exterior care să cauzeze anularea curentului electric total măsurat; această diferență de potențial specifică se mai numește '*reversal potential*'. Așa după cum vom demonstra ulterior, există o relație matematică relativ simplă care, pe baza informațiilor despre ($V_{eq.}$), permite determinarea raportului între permeabilitățile ionilor difuzanți. În procesul de permeație prin canale ionice, există două paradigme esențiale prin care se poate explica selecția unor ioni difuzanți, în raport cu alții; în ambele cazuri, forțele de interacțiune ce se stabilesc între ioni și structura regiunii de selectivitate sunt decisive:

a. **selecția sterică**, bazată pe considerente geometrice și cauzată fizic de principiul de excluziune al lui Pauli; raza de hidratare a ionului de potasiu este mai mare decât cea a ionului de sodiu și deci ionii de potasiu sunt excluși de la difuzia prin canale de sodiu;

b. **selecția energetică**, bazată pe interacțiuni electrostatice de tip 'ion' – 'dipol', ce are loc în zona filtrului de selectivitate. Astfel, chiar dacă raza de hidratare a ionilor de sodiu este mai mică decât a celor de potasiu, ei sunt excluși, în mare parte, de la difuzia prin canale ionice de potasiu, deoarece energia de hidratare a ionilor de sodiu este mult mai mare decât energia lor de interacție cu aminoacizii din filtrul de selectivitate. Astfel, pentru dipoli electrici mobili cu momentul dipolar permanent (u) situați la distanța (r) de centrul unor sarcini electrice (Q) considerate cu geometrie sferică, valoarea energiei de interacțiune electrostatică este dată de:

$$W_{ion-dipole} = -\frac{Q^2 u^2}{6(4\pi\varepsilon_0)^2 kTr^4} \qquad (33)$$

Din analiza formulei de mai sus (unde k este constanta lui Boltzmann, T este temperatura absolută a mediului în care este studiat procesul, iar ceilalți parametri au semnificațiile deja discutate), devine limpede că energia de hidratare ionică, dată, în principal, de interacțiunile ion – dipol cu moleculele de apă din prima sferă de hidratare, este cu atât mai mare, cu cât raza ionică este mai mică. În acest fel, ionii de sodiu hidratați nu pot 'pierde' moleculele de apă din prima zonă de hidratare prin interacțiuni electrostatice complementare cu filtrul de selectivitate, și deci dimensiunile lor (hidratate) nu permit difuzia prin zona filtrului de selectivitate (din considerente de stericitate – ionii de sodiu hidratați au raza mai mare decât ionii de potasiu nehidratați). Ionii de potasiu hidratați (cu energie de hidratare mai mică decât a ionilor de sodiu) sunt ușor dehidratabili în zona filtrului de selectivitate, și deci devin permeanți prin canalul ionic.

O altă proprietate extrem de interesantă a canalelor ionice, a cărei relevanță pentru procesele celulare fiziologice normale și patologice este extremă, se referă la procesul cinetic de închidere și deschidere stochastică a porului apos. Această proprietate se numește '*gating*' și se materializează fizic prin intermediul tranzițiilor stochastice între conformații neconductive și conductive ale canalelor ionice pentru transportul ionic. Proprietatea de '*gating*' este influențabilă de interacțiunea canalului

ionic cu molecule extracelulare, mesageri secundari intracelulari, metaboliţi, procese de fosforilare etc. Unul dintre cei mai importanţi factori fizici care afectează '*gating*'-ul canalelor ionice implicate în conducerea potenţialelor de acţiune, îl constituie diferenţa de potenţial transmembranar. Pentru a înţelege mai bine noţiunea de '*gating*', vom anticipa acum unele aspecte esenţiale ale sale. În Fig. 19 este prezentată o înregistrare experimentală a curentului electric macroscopic mediat de canalele ionice de potasiu, activate în urma depolarizării membranei celulare. În condiţii experimentale speciale ('*patch-clamp*') pe care le vom detalia într-un alt capitol, există posibilitatea înregistrării curentului ionic mediat de un singur canal ionic, izolat din întreaga populaţie prezentă în membrana celulară. Spre deosebire de observarea unui curent macroscopic, obţinut în urma înregistrării funcţionării simultane a mai multor canale ionice, tehnica '*patch-clamp*', care va fi detaliată în capitolele următoare, permite extragerea unei singure proteine din întreaga populaţie de canale ionice active şi analizarea curentului electric mediat de aceasta.

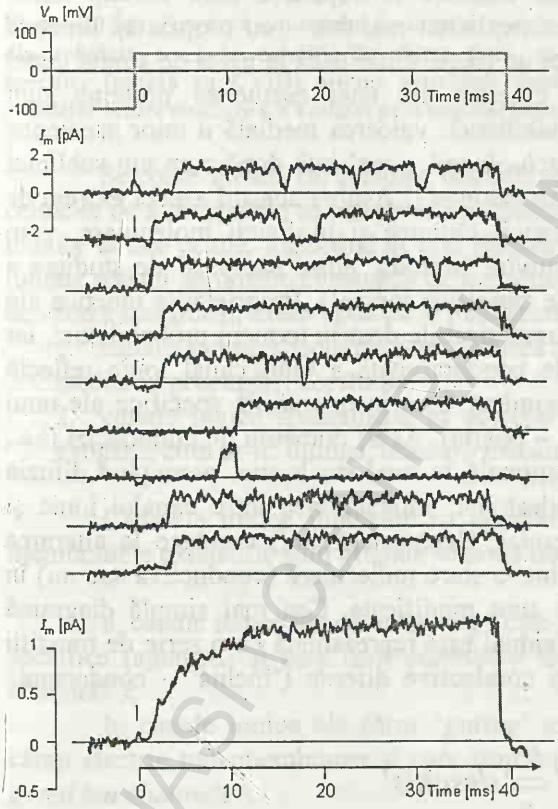


Figura 19 Înregistrare '*patch-clamp*' a curentului ionic de potasiu mediat de canalele ionice de potasiu din axonul de calmar (I_K), după cum rezultă în urma depolarizării membranare de la –100 la +50 mV. În panelul de sus, sunt prezentate nouă înregistrări succesive ale curentului electric de potasiu de tip '*patch-clamp*'. În panelul de jos, este prezentat rezultatul medierii statistice ('*ensemble average*') a înregistrărilor experimentale din panelul precedent, ce exprimă dependenţa temporală a lui I_K, aşa cum ar fi înregistrată în urma măsurătorilor macroscopice ale curentului ionic de potasiu (vezi text).

În acest caz, se observă că proprietăţile cinetice ale curenţilor ionici individuali diferă radical de cele ale curentului macroscopic (Fig. 19, panelul de sus); curentul electric printr-un singur canal ionic variază abrupt, iar durata temporală pentru care canalul ionic este în stare conductoare sau neconductoare este o mărime stochastică. În panelul de jos, Fig. 19, este reprezentat rezultatul medierii celor nouă înregistrări de curent electric măsurate

printr-un singur canal ionic, în condiții de '*patch-clamp*' ; astfel, la orice moment de timp 't', valoarea mediată a curentului electric $I_m(t)$ este, de fapt, rezultatul unui '*ensemble average*' (vezi capitolul 'Descrierea microscopică a fenomenelor de transport cu aplicații în biofizica moleculară') făcut pe cele nouă realizări independente. Echivalent, dacă membrana celulară studiată ar conține doar nouă canale ionice identice și independente și dacă am realiza câteva măsurători de curent electric 'macroscopic' prin toate cele nouă canale ionice, în urma operației de mediere ('*ensemble average*') a respectivelor măsurători și împărțirea ulterioară a curentului electric 'macroscopic' mediat la numărul de canale ionice din membrană, ne-am aștepta să obținem un rezultat cvasi-identic ca în situația precedentă. Înțelegerea acestei afirmații va fi mai facilă după parcurgerea capitolului 'Metoda '*noise analysis*' de studiere a proprietăților cinetice și de transport ale canalelor ionice'. După cum se observă din Fig. 19, variația în timp a curentului ionic mediat urmează o lege temporală cvasi-deterministă (panelul de jos), iar repetarea acestui experiment în condiții de laborator perfect identice ar conduce la obținerea unor curenți ionici 'macroscopici', 'mediați' – așa cum am explicitat mai sus – cu proprietăți cinetice similare. Este remarcabil de observat aici un lucru: chiar dacă la nivel de singur canal ionic ('*single channel*') proprietățile cinetice ale unei asemenea proteine sunt caracterizabile exclusiv în termeni probabilistici, valoarea mediată a unor asemenea înregistrări de curent electric de tip '*patch-clamp*' – realizată după cum am subliniat anterior – generează un curent electric determinist !! Asupra acestui aspect extrem de important pentru întreaga știință a cineticii chimice și biofizicii moleculare, vom reveni într-un capitol ulterior (vezi capitolul 'Metoda '*noise analysis*' de studiere a proprietăților cinetice și de transport ale canalelor ionice'). Proprietățile cinetice ale canalelor ionice individuale sunt deci caracterizabile doar în termeni probabilistici, iar tranzițiile bruște observate în starea de conductivitate a unui canal ionic reflectă proprietatea sa de '*gating*' și au corespondent fizic în orientările specifice ale unui domeniu proteic definit (denumit '*gate*' – poartă). Acest domeniu de aminoacizi (i.e., poartă) își schimbă orientarea conformațională în mod stochastic, permițând difuzia ionilor prin canalul ionic în manieră aleatoare; interacțiunea între canalul ionic și diferiți stimuli (electrici, chimici, mecanici, electromagnetici) conduce la alterarea ratelor de tranziție ale canalului ionic dintr-o stare moleculară (conductivă sau nu) în alta, în care proprietățile de conducție sunt modificate. Cea mai simplă diagramă cinetică a unui canal ionic analizat individual este reprezentată ca o serie de tranziții aleatorii între două stări, cu proprietăți conductive diferite ('închis' – conductanță nulă, 'deschis' – conductanță ne-nulă):

$$'închis' \underset{\beta}{\overset{\alpha}{\Leftrightarrow}} 'deschis'$$

În cazul canalelor ionice voltaj-dependente, o modificare (depolarizare) a diferenței de potențial transmembranar conduce alosteric la modificarea ratelor de tranziție între stările 'închis' și 'deschis' ale canalelor ionice individuale. Rezultatul macroscopic net evidențiat în Fig. 19, panelul de jos, obținut prin medierea curenților electrici individuali, indică creșterea curentului ionic macroscopic după o lege

temporală cu caracter deterministic. În acest fel, spunem că modificarea diferenţei de potenţial transmembranară a alterat proprietăţile de '*gating*' ale canalelor ionice, fapt dovedit de modificarea caracteristicii de conductivitate (i.e., magnitudinea curentului electric mediat) a ansamblului de canale ionice.

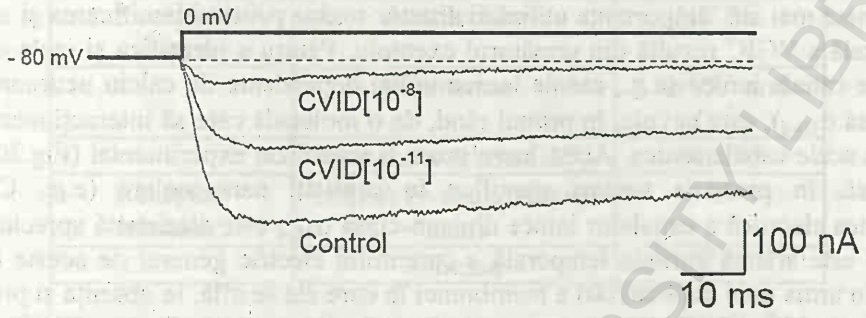


Figura 20 Înregistrarea curentului ionic prin canale ionice voltaj-dependente de calciu neuronale din subclasa α_{1B-d} în condiţii de voltaj fixat, ce arată acţiunea inhibitoare a unei toxine specifice (notată cu CVID) asupra activităţii electrice ale acestor canale ionice. Deschiderea canalelor ionice studiate s-a realizat prin depolarizarea celulei de la –80 mV la 0 mV.

Se poate aprecia că, evolutiv, canalele ionice au apărut drept rezultat al necesităţii celulelor de a fi capabile să recepţioneze informaţii din mediul extern şi de a le transmite ulterior la alte celule, înglobând în acel răspuns propria lor contribuţie de informaţie. În lumina acestui argument, evidenţele experimentale adunate până acum arată că, din punct de vedere funcţional, există două clase fundamentale de canale ionice:

1. canale ionice specializate în codarea informaţiei în potenţialele de acţiune şi medierea propagării acestora;
2. canale ionice specializate în detecţia şi apoi transducerea diferiţilor stimuli exogeni, cum ar fi: lumina, tensiuni mecanice, temperatura, stimuli chimici etc.

Canalele ionice implicate în generarea semnalelor electrice propagabile în membranele excitabile sunt grupate în două mari categorii:

a. canale ionice ale căror '*gating*' este modulat de interacţiunea lor cu molecule specifice (agonişti) şi care sunt cunoscute sub numele de LGIC ('*ligand gated ion channels*');

b. canale ionice ale căror '*gating*' este modulat de interacţiunea lor cu un câmp electric transmembranar şi care sunt cunoscute sub numele de VGIC ('*voltage gated ion channels*').

Aşa după cum am subliniat mai sus, canalele ionice voltaj-dependente (VGIC – '*voltage gated ion channels*') reprezintă o clasă particulară de proteine membranare integrale, care permit controlul concentraţiei intra- şi extracelulare de ioni, în funcţie de valoarea diferenţei de potenţial transmembranară a unei celule vii. Cele mai importante clase de canale ionice voltaj-dependente, cu rol esenţial în modularea

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

excitabilității nervilor şi muşchilor, sunt canalele ionice de sodiu, potasiu şi calciu. Izolarea, purificarea şi descrierea moleculară a acestor canale ionice a fost foarte mult favorizată de descoperirea unor toxine naturale (e.g., TTX, STX, μ-conotoxinele, batrachotoxina, grayanotoxina etc.) care interacționează într-un înalt grad de specificitate cu diferite categorii de canale ionice voltaj dependente din clasele menționate mai sus. Importanța utilizării acestor toxine pentru identificarea şi analiza structurală a VGIC rezultă din următorul exemplu. Pentru a identifica şi izola o nouă clasă de canale ionice (e.g., canale ionice voltaj-dependente de calciu neuronale din sub-clasa $\alpha_{1B\text{-}d}$), este nevoie, în primul rând, de o moleculă care să interacționeze specific cu acele canale ionice. Acest lucru poate fi vizualizat experimental (Fig.20) prin aceea că, în prezența toxinei specifice în cantități nano-molare (e.g., CVID), activitatea electrică a canalelor ionice din sub-clasa $\alpha_{1B\text{-}d}$ este diminuată apreciabil. În Fig. 20 este arătată variația temporală a curentului electric generat de aceste canale ionice în urma unei depolarizări a membranei în care ele se află, în absența şi prezența a 10^{-11} şi 10^{-8} CVID. După cum se observă din această figură, CVID într-o concentrație de aproximativ 10 nM inhibă la aproximativ 50 % activitatea electrică a acestor canale ionice de calciu. Ținând cont şi de faptul că CVID nu exercită aceeaşi acțiune asupra altor canale ionice, se poate afirma că această toxină este un candidat excelent pentru încercarea de izolare şi purificare a canalelor ionice voltaj dependente de calciu, din clasa $\alpha_{1B\text{-}d}$. Odată ce a fost găsit 'glontele magic' care 'loveşte' doar canalele ionice de izolat, utilizarea tehnicilor moderne de izolare proteică (e.g., cromatografie cu schimbători de ioni, '*lecitine-Sepharose*', cromatografie, centrifugarea în gradient de densitate) duce, în final, la izolarea şi purificarea acestor proteine. În cele ce urmează, vom face câteva referiri succinte la două din cele mai importante clase de canale ionice voltaj-dependente (VGIC) implicate în procesele fundamentale de transmisie a informației între celulele excitabile prin intermediul potențialelor de acțiune: canale ionice de potasiu şi canale ionice de sodiu.

LGIC reprezintă o familie foarte importantă de proteine specializate în medierea transmisiei informației sinaptice, prin interacțiunea specifică a lor cu o clasă particulară de agonişti, numiți neurotransmițători (e.g., acetilcolina, glicina, glutamat, dopamina, serotonina, histaminele, ATP-ul). În tabelul de mai jos, este prezentată o listă comprehensivă a celor mai importanți LGIC, împreună cu agoniştii lor specifici:

BCU IASI

Tabel 2. Agoniştii specifici pentru câţiva dintre cei mai importanţi LGIC (*'ligand gated ion channels'*).

TIP FUNCŢIONAL	AGONIST	LGIC
Receptori excitatori	Acetilcolina	Na^+/K^+
	Glutamat	Na^+/K^+ and Ca^{2+}
	Serotonina (clasa $5HT_3$)	Na^+/K^+
Receptori inhibitori	GABA (γ-aminobutyric acid)	Cl^-
	Glicina	Cl^-

În tabelul de mai sus, numele LGIC-ului indică ionii permeabili prin canalul ionic. O trăsătură foarte importantă a acestor clase de proteine o reprezintă caracterul lor dual: de receptor pentru un agonist specific şi de proteină ce mediază difuzia ionică prin membrane (i.e., canal ionic). Interacţiunea specifică între molecule de ligand şi LGIC determină schimbări conformaţionale de structură ale acestora, fapt ce cauzează activarea (deschiderea) porţii canalului ionic. În tabelul de mai sus, se subliniază faptul că primele trei tipuri de LGIC permit difuzia cationilor prin membrana biologică, provocând depolarizarea membranei postsinaptice şi, implicit, excitarea ţesutului post-sinaptic; de aceea, aceştia sunt denumiţi receptori excitatori. Ultimele două tipuri de LGIC devin permeabile pentru anioni şi determină hiperpolarizarea ţesutului post-sinaptic, fiind denumiţi receptori inhibitori. Modificarea diferenţei de potenţial transmembranar a ţesutului post-sinaptic se realizează într-un interval foarte scurt de timp (0.1 – 2 ms) după interacţiunea LGIC cu agonistul specific; din acest motiv, sinapsele constituite prin intermediul acestor LGIC se numesc sinapse rapide.

Foarte multe funcţii din sistemul nervos se desfăşoară însă cu o cinetică lentă, de ordinul secundelor sau chiar minutelor. În aceste cazuri, informaţia sinaptică este mediată de o clasă specială de LGIC, denumită proteina G – LGIC. Spre deosebire de LGIC-urile discutate anterior, în care receptorul pentru agonist şi canalul ionic reprezentau una şi aceeaşi proteină, în cazul proteinei G – LGIC, canalul ionic şi receptorul pentru agonist reprezintă două entităţi proteice distincte. Interacţiunea dintre neurotransmiţător şi receptor determină activarea unei proteine cu rol unic în comunicarea inter-celulară (proteina G), care, prin cuplarea cu enzime specifice (e.g., adenilat-ciclaza, fosfolipaza C), determină generarea unor molecule intermediare în transmiterea informaţiei, denumite mesageri de ordinul 2, cum ar fi cAMP, ioni de Ca^{2+}. Mesagerii de ordinul 2 sunt cei care interacţionează cu canale ionice ce au afinitate pentru ei, modulându-le astfel permeabilitatea ionică. Sinapsele cu o asemenea arhitectură moleculară a transmisiei de informaţie se numesc sinapse lente.

2.1. Canale ionice de potasiu. Caracteristici generale structurale şi funcţionale

Aşa după cum este sugerat şi de numele lor, aceste canale ionice facilitează difuzia transmembranară a ionilor de potasiu, în virtutea gradientului lor electrochimic. Prezenţa fluxurilor ionice de potasiu este esenţială pentru numeroase procese celulare, cum ar fi: reglarea volumului celular, secreţia hormonală, excitabilitatea nervoasă. În cea mai simplă arhitectură, canalele de potasiu voltaj-dependente au structura cuaternară homotetramerică, în care fiecare subunitate conţine un domeniu aminoacidic cu rol de senzor de potenţial electric transmembranar şi un domeniu aminoacidic cu rol direct în constituirea porului permeant (Fig. 21).

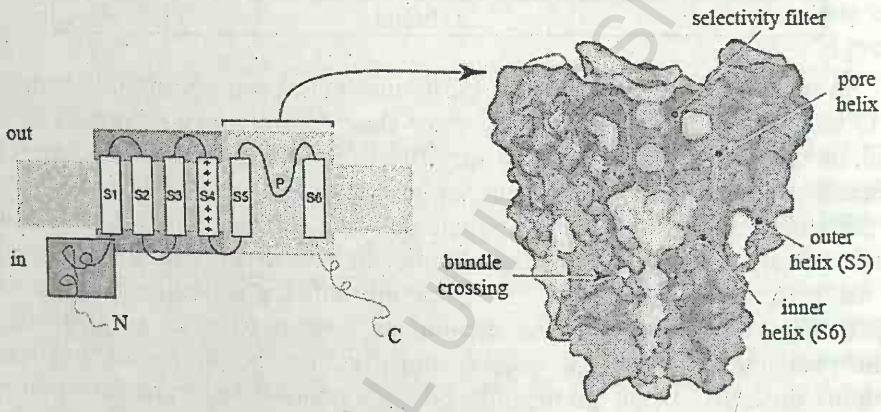


Figura 21 Într-o reprezentare tipică, un canal ionic voltaj-dependent de potasiu este structurat ca o proteină tetramerică, iar fiecare monomer din acest homooligomer are 6 domenii de tip α helix (notate cu S1..S6). Filtrul de selectivitate ionică (*'selectivity filter'*) este format de un domeniu peptidic (P) ce leagă domeniile S5 şi S6, iar domeniul cu rol de senzor de diferenţe de potenţial transmembranar include, mai ales, domeniul S4. Unul din cele mai simple canale ionice de potasiu (KcsA) conţine doar 2 segmente transmembranare (S5 şi S6), aşa cum este figurat în partea dreaptă a acestei figuri. Regiunea vestibulară a acestui canal ionic este formată din ordonarea spaţială a domeniilor S6 (denumite şi *'inner helix'*) (adaptat din *www*).

Elucidarea elementelor structurale şi funcţionale ale canalelor ionice de potasiu a fost posibilă prin munca asiduă a extrem de mulţi cercetători, reprezentaţi probabil cel mai bine de R. MacKinnon şi D.A. Doyle. Studii de cristalografie cu radiaţii X de înaltă rezoluţie (2.0 Å) realizate pe canalul ionic de potasiu KcsA izolat din *S. lividans* au identificat detalii de structură esenţiale pentru funcţia biologică a acestor proteine. Astfel, porul canalului ionic este constituit din 4 subunităţi identice, a căror dispunere spaţială simetrică defineşte porul permeant al acestui canal ionic (Fig. 22).

BCU "ALEXANDRU IOAN CUZA" UNIVERSITY LIBRARY

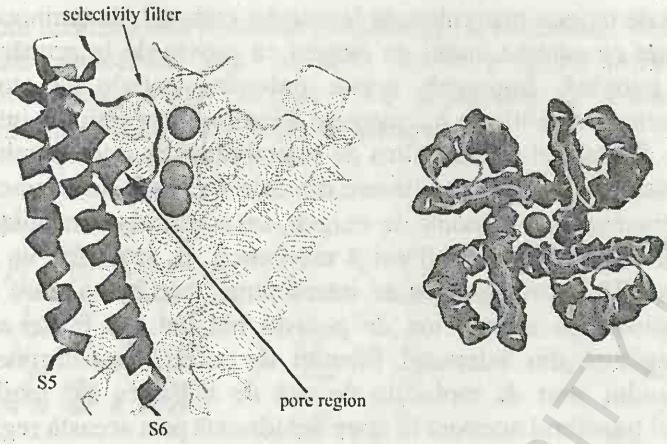


Figura 22 Reprezentare derivată din modelarea moleculară a structurii cristaline a canalului ionic de potasiu KcsA izolat din *S. lividans* în care sunt ilustraţi cei 4 monomeri, aşa cum sunt dispuşi spaţial pentru formarea canalului ionic. Evidenţierea unui monomer împreună cu 3 ioni de potasiu (desenaţi ca nişte sfere), aşa cum au fost surprinşi în procesul de difuzie, este făcută pentru a uşura vizualizarea domeniilor peptidice ce participă în formarea porului permeant şi a filtrului de selectivitate pentru acest canal ionic.

Fiecare subunitate a acestui homo-tetramer conţine două domenii peptidice de tip '*α helix*' ce traversează integral biomembrana celulară, denumite convenţional '*inner*' şi '*outer*' în funcţie de apropierea relativă faţă de volumul căii de permeaţie ionice (subunitatea '*inner*' este mai apropiată faţă de porul permeant). De asemenea, toate cele 4 subunităţi contribuie la constituirea porului permeant ('*pore region*' – Fig. 22) cu câte un domeniu '*α helix*' ce are capătul terminal carboxil orientat spre calea de permeaţie ionică, este orientat oblic faţă de planul membranei şi care pătrunde doar până la aproximativ mijlocul membranei. În apropierea regiunii centrale a biomembranei, porul permeant al acestui canal ionic de potasiu se lărgeşte formând o cavitate 'apoasă' cu un diametru de ~ 10 Å, creând astfel premisele ca un ion de potasiu hidratat să poată fi acomodat energetic în interiorul biomembranei şi înainte de a o traversa. Este remarcabilă simplitatea soluţiei oferită de milioane de ani de evoluţie, pentru implementarea unor detalii structurale de arhitectură proteică care să faciliteze fluxuri mari de ioni de potasiu prin biomembrane. Datorită prezenţei apei în cavitatea porului canalului ionic, precum şi a orientării favorabile a dipolilor electrici a domeniilor '*α helix*' ce constituie 'pereţii laterali' ai acestui por – capetele carboxil sunt orientate spre cavitatea cvasi-centrală a porului – ionii de potasiu ce urmează a difuza prin canalul ionic reuşesc să învingă bariera de energie 'dielectrică' biomembranară, fiind astfel stabilizaţi energetic în interiorul biomembranei.

Procesul de selectivitate ionică a acestor canale ionice are loc într-o regiune structurală specială, numită filtru de selectivitate ionică. Este de reţinut remarcabila conservare structurală a acestei regiuni pentru toate canalele ionice de potasiu cunoscute în natură; cu o lungime de ~ 12 Å, filtrul de selectivitate este format din aminoacizii TVGYG din poziţiile 75-79 ce provin de la toţi cei 4 monomeri ai canalului ionic. Odată ajuns în această regiune, un ion de potasiu 'întâlneşte' 4 regiuni

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

ce conțin atomi de oxigen provenind de la grupări carbonil ale aminoacizilor V, G, Y şi G şi 1 regiune ce conține atomi de oxigen ce provin de la grupările hidroxil ale aminoacidului treonină. Împreună, aceste ordonări spațiale de atomi de oxigen formează 4 situsuri favorabile de interacțiune a ionilor de potasiu cu interiorul filtrului de selectivitate. Diametrul acestui filtru de selectivitate este comparabil cu diametrul ionilor de potasiu dehidratați, iar în fiecare din cele 4 situsuri de interacțiune un ion de potasiu interacționează, cu 8 atomi de oxigen, ce constituie contribuțiile domeniilor corespunzătoare TVGYG de la toți cei 4 monomeri. În acest fel, un ion de potasiu dehidratat ce se află în oricare situs de interacțiune, este într-o stare de interacțiune energetic-echivalentă cu a unui ion de potasiu hidratat. Se poate aprecia deci că situsurile de legătură din interiorul filtrului de selectivitate 'mimează' energetic contribuția primului strat de molecule de apă de hidratare ale ionilor de potasiu, favorizând astfel transferul acestora în stare dehidratată prin această regiune (Fig. 23).

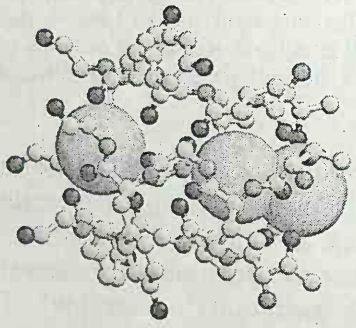


Figura 23 Modelarea moleculară a complexării chimice a 3 ioni de potasiu (sferele mai mari) de situsuri specifice din interiorul filtrului de selectivitate ionică al canalului de potasiu KcsA, date de ordonări spațiale de atomi de oxigen provenind de la grupări carbonil ale amino-acizilor V, G, Y şi G şi de la grupările hidroxil ale aminoacidului treonină.

Date fiind existența acestor stări favorabile energetic pentru interacțiunea ionilor de potasiu dehidratați şi situsurile din filtrul de selectivitate, cum se poate explica totuşi faptul că aceste interacțiuni nu conduc la un fenomen de limitare a ratelor de tranziție a ionilor de potasiu prin aceste canale ionice? În fond, energia de interacție minimă dată de forțe electrostatice de atracție manifestate coordinativ în acest sistem ar trebui să contribuie la stabilizarea ionilor de potasiu în interiorul filtrului de selectivitate. O indicație științifică esențială pentru explicarea celui mai important fenomen fizic ce asigură rate de tranziție optime ale ionilor de potasiu prin filtrul de selectivitate este aceea că, din experimente de cristalografie, s-a concluzionat prezența simultană în interiorul filtrului de selectivitate a 2 ioni de potasiu separați de o singură moleculă de apă. O posibilă explicație pentru starea de relativ echilibru electrostatic a filtrului de selectivitate împreună cu 2 ioni de potasiu în interiorul acestuia este dată de considerente de sarcini electrice parțiale; două sarcini elementare pozitive asociate cu prezența a doi ioni de potasiu se pare că sunt suficiente pentru a compensa contribuțiile sarcinilor electrice negative parțiale ale celor 20 atomi de oxigen din interiorul filtrului de selectivitate, asigurând astfel stabilitatea structurii tridimensionale a acestuia. Când un al 3-lea ion de potasiu difuzează, dintr-o parte sau de alta a canalului ionic, spre interiorul filtrului de selectivitate, starea de relativ echilibru electric al sistemului filtru de

selectivitate – ioni rezidenţi este perturbată, conducând la excluderea unuia dintre ei spre mediul intra- sau extracelular. Aşa cum este ilustrat în figura următoare (Fig. 24), permutarea ionică topologică din poziţiile 1 – 3 în poziţiile 2 – 4 constituie, în fapt, procesul de permeaţie ionică prin canalele de potasiu.

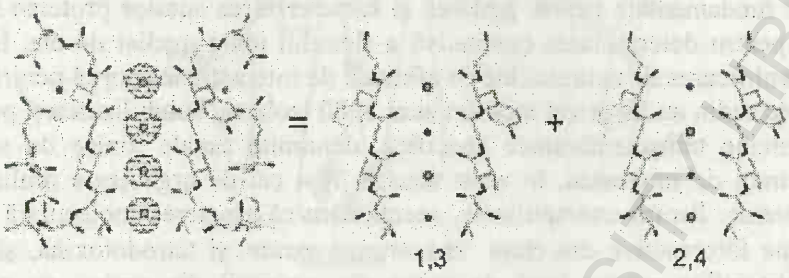


Figura 24 Reprezentarea simplificată, derivată din rezultate de cristalografie cu raze X realizate pe canalul de potasiu KcsA, a secvenţelor discrete asociate cu tranziţiile ionilor de potasiu prin filtrul de selectivitate ionică. Dacă iniţial în interiorul filtrului de selectivitate se aflau 2 ioni de potasiu în poziţiile 1 şi 3, difuzia în interiorul acestui por a unui alt ion de potasiu conduce la excluderea unuia dintre ei spre mediul intra- sau extracelular, iar ionii ce rămân în filtrul de selectivitate sunt dispuşi în poziţiile 2 şi 4 (adaptat *R. MacKinnon, FEBS Letters, 555, 2003*).

Deci, prezenţa simultană a 3 ioni de potasiu într-un domeniu de ordinul ~ Å contribuie prin intermediul fenomenelor de repulsie electrostatică la destabilizarea energetică a interacţiilor acestora cu situsurile domeniilor corespunzătoare TVGYG, asigurându-se astfel rate mari de translocare ionică prin filtrul de selectivitate care să poată justifica utilitatea acestor canale ionice pentru fiziologia unei celule vii.

2.2. Canale ionice de sodiu. Caracteristici generale structurale şi funcţionale

Canalele ionice voltaj-dependente de sodiu sunt esenţiale pentru etapa de depolarizare celulară, asociată cu iniţierea potenţialelor de acţiune în neuroni şi majoritatea celorlaltor celule excitabile. Primele rezultate experimentale care au favorizat ideea existenţei unor căi de permeaţie independente pentru curenţi ionici de sodiu transmembranari au fost obţinute încă din anii 1960 de către A. L. Hodgkin şi A. F. Huxley. Aşa după cum voi prezenta şi într-un capitol ulterior, prin utilizarea unei tehnici remarcabile de înregistrare a curenţilor ionici transmembranari (i.e., '*voltage-clamp*') prin axonii 'giganţi' izolaţi din calmari, cei doi cercetători au identificat trei caracteristici fizice fundamentale ale structurilor transmembranare responsabile pentru medierea difuziei ionilor de sodiu : (a) activarea voltaj-dependentă a acestor structuri (b) inactivarea rapidă a lor şi (c) fenomenul de difuzie selectivă a ionilor de sodiu mediat de aceste structuri. Trebuie remarcat că în acea vreme nu se cunoştea şi deci nu se utiliza conceptul de 'canal ionic', ca unitate proteică fundamentală implicată în medierea difuziei pasive ionice prin biomembrane. Cu toate acestea, emergenţa acelui concept revoluţionar de 'cale transmembranară de permeaţie ionică selectivă' a

constituit fundamentul ştiinţific ce a favorizat abordarea detaliată a paradigmei de structură proteică care să fie responsabilă pentru aceste fenomene. Astfel, încă din anii 1970, au fost iniţiate studii pentru optimizarea tehnicilor de analiză moleculară a ceea ce urmau să se denumească 'canale ionice de sodiu'. Pentru a susţine ştiinţific conceptul de 'canal ionic', cercetătorii au trebuit să dezvolte tehnici biofizice şi biochimice fundamentale pentru izolarea şi caracterizarea acestor proteine specifice, precum şi pentru determinarea cantitativă a fluxului ionic mediat de ele. În această direcţie, identificarea de neurotoxine cu afinitate de interacţiune sporită pentru căile de permeaţie de sodiu au favorizat încă din anul 1980 izolarea, solubilizarea şi purificarea acestor proteine transmembranare specifice, denumite canale ionice de sodiu. Un rezultat extrem de interesant, în acest sens, a fost cel de organizare multimerică a acestor proteine. Pentru exemplificare, menţionăm că asocierea moleculară specifică dintre toxine fotoreactive din clasa '*α-scorpion toxins*' şi tetrodotoxină, şi căile de permeaţie specifice pentru ionii de sodiu din neuronii din creier, au condus la identificarea unei structuri trimerice a canalului ionic de sodiu din aceste celule, date de o subunitate proteică principală denumită 'α' (260 kDa) şi două auxiliare de 36 kDa, denumită 'β1' şi 33 kDa denumită 'β2'. Pe de altă parte, însă, canalele ionice de sodiu din peştii electrici au fost dovedite a avea structură monomerică cu greutatea moleculară de 270 kDa, iar cele izolate din muşchii scheletici au structură dimerică. Cu toate că numărul cercetătorilor implicaţi în aceste proiecte de identificare, izolare şi caracterizare moleculară a canalelor ionice de sodiu a fost substanţial, merită să menţionăm câteva nume de referinţă în acest sens: D.A. Beneski, M. Noda, W.A. Catterall, R.P. Hartshorne, R.L. Barchi şi C. Miller.

Utilizând tehnici specifice de genetică moleculară, M. Noda şi colaboratorii săi au stabilit în anul 1984 un nou punct de referinţă în aventura ştiinţifică de caracterizare moleculară a canalelor ionice de sodiu, prin deducerea secvenţei de aminoacizi a canalului ionic izolat din peştii electrici care era cel mai simplu din punct de vedere al organizării oligomerice. Astfel, ei au concluzionat că din punct de vedere structural, acest canal ionic este compus din 4 domenii aminoacidice asemănătoare şi fiecare din aceste domenii îndeplinea condiţiile de compoziţie primară pentru a se organiza în structuri secundare de '*α helix*'. Informaţiile ştiinţifice deduse din munca acestor cercetători au fost caracterizate drept revoluţionare pentru studierea canalelor ionice voltaj-dependente, întrucât cercetări ulterioare au stabilit că maniera de organizare structurală a canalului ionic de sodiu din peştii electrici este comună şi pentru canalele ionice voltaj-dependente de calciu, de potasiu, precum şi a canalelor ionice modulate de nucleotidele ciclice. În studiile de biofizică şi biologie moleculară a canalelor ionice, una din strategiile esenţiale pentru caracterizarea eficientă a proprietăţilor acestor proteine este de a implementa protocoale de exprimare exogenă a acestor proteine în sisteme de expresie specifice, care să furnizeze 'la cerere' experimentatorilor cantităţi suficiente din aceste proteine.

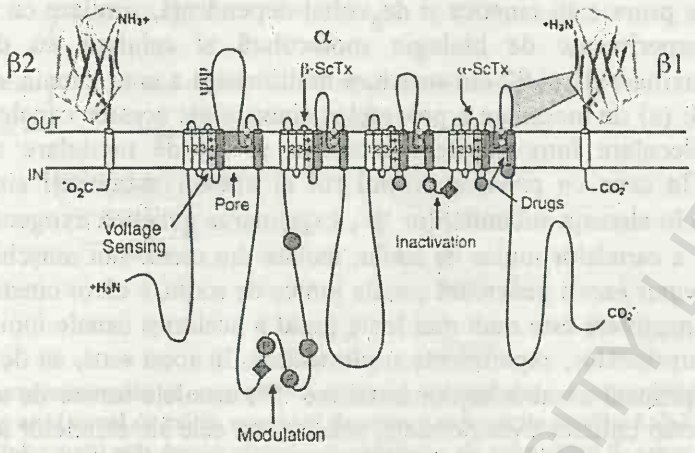


Figura 25 Ilustrare simplificată a subunităţilor unui canal de sodiu voltaj-dependent, cu evidenţierea domeniilor '*α helix*' S1..S6 (desenate ca nişte cilindri transmembranari), a situsurilor de modulare prin procese de fosforilare a proprietăţilor biofizice ale acestui canal ionic (marcate cu 'P'), a situsurilor de interacţiune specifică cu toxine (α- şi β-*scorpion toxins*) ce au ajutat la purificarea acestui canal ionic, a domeniilor implicate în formarea senzorului de diferenţă de potenţial transmembranar ('*voltage sensing*') şi a porului canalului ionic ('*pore*'), precum şi a regiunilor aminoacidice implicate în formarea domeniului de inactivare şi a receptorului molecular pentru acest domeniu (vezi text). Suplimentar, sunt prezentate subunităţile auxiliare extracelulare β1 şi β2 ce joacă un rol esenţial în funcţionarea fiziologică normală a acestui canal ionic (adaptat din *W. A. Catterall, Neuron, 26, 2000*).

Într-o categorie de astfel de experimente în care s-a încercat exprimarea canalelor ionice de sodiu în oocyte izolate din broasca *Xenopus laevis*, s-a observat că injectarea intracelulară a ARN-ului mesager ce codează pentru exprimarea genetică a subunităţii principale 'α' a canalelor de sodiu din creierul de şobolan este suficientă pentru a genera în membrana oocytelor canale ionice permeabile pentru ionii de sodiu.

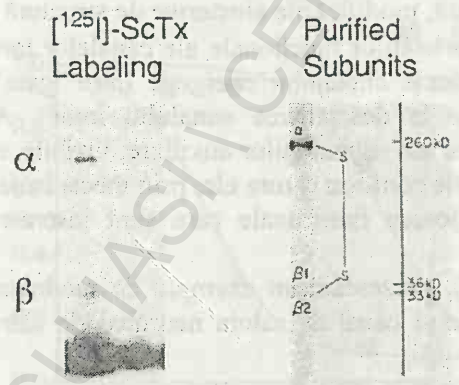


Figura 26 Rezultatele electroforezei pe gel de SDS-poliacrilamidă, care evidenţiază prezenţa separabilă a subunităţilor α şi β din canalele de sodiu izolate din creier de şobolan. Pentru optimizarea acestei separări, proteinele au fost marcate covalent cu o toxină specifică marcată radioactiv (^{125}I-*scorpion toxin*). În partea dreaptă, sunt ilustrate subunităţile separate α şi β1 şi β2, împreună cu masele lor exprimate în Daltoni; suplimentar, în această parte a figurii este evidenţiată prezenţa legăturii bi-sulfidice între subunităţile α şi β2 (adaptat din W. A. Catterall, *Neuron*, 26, 2000).

Cu toate acestea, coasocierea între subunitatea principală 'α' şi subunităţile auxiliare 'β' s-a dovedit a fi esenţială pentru obţinerea unor canale ionice de sodiu

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

care să posede proprietăți cinetice şi de voltaj-dependență, similare cu cele '*in-vivo*'. Numeroase experimente de biologie moleculară şi celulară au demonstrat că subunitățile auxiliare β1 şi β2 din structura multimerică a unor canale ionice de sodiu au un rol dual: (a) de modulare a proceselor cinetice ale acestor canale ionice pentru tranzițiile moleculare între stările conductive şi (b) de modulare a interacțiunii intercelulare. În ceea ce priveşte primul rol al acestor subunități auxiliare, a fost demonstrat că în absența subunităților 'β', exprimarea genetică exogenă a subunității principale 'α' a canalelor ionice de sodiu, izolate din creier sau muşchii scheletici în oocyte de *Xenopus laevis* generează canale ionice de sodiu, a căror cinetică de activare şi, respectiv, inactivare este mult mai lentă decât a aceloraşi canale ionice studiate *in-vivo*. Deloc surprinzător, experimente suplimentare, în acest sens, au demonstrat că în prezența coexprimată a subunităților auxiliare 'β', canalele ionice de sodiu rezultate posedă proprietăți cinetice cvasinormale, similare cu cele ale canalelor ionice de sodiu naturale. În ceea ce priveşte cealaltă funcție a subunităților auxiliare, evidențele experimentale care sugerau implicarea subunităților auxiliare 'β' în medierea interacțiunilor intercelulare în sistemul nervos, precum şi în alte țesuturi, au fost susținute de asemănarea structurală a acestor subunități cu molecule specifice implicate în procesele de adeziune intercelulară. Experimente de transfecție genetică au demonstrat că exprimarea transmembranară a subunităților auxiliare 'β' din structura multimerică a canalelor ionice de sodiu voltaj-dependente conduce la un fenomen de respingere a celulelor rezultate de către suprafețe acoperite cu proteine implicate direct în adeziunea celulară (e.g., tenascin R). Relevanța fiziologică a acestor procese de recunoaştere celulară mediate de subunitățile auxiliare 'β' constă în posibila formare a unor regiuni celulare axonale, cu densitate mare de canale ionice de sodiu, cum ar fi nodurile Ranvier. Mecanismele moleculare prin care subunitățile proteice auxiliare ale unui canal ionic modulează proprietățile sale biofizice şi farmacologice rămân încă, în mare parte, subiecte ştiințifice deschise. Conform datelor experimentale actuale, un mod de explicare al efectelor exercitate de aceste subunități se bazează pe mecanisme de alostericitate proteică: astfel, în urma interacțiunii subunitate principală (α) – subunitate auxiliară, modificările alosterice de structură ale subunității α se reflectă în modificarea proprietăților funcționale ale canalelor ionice (e.g., probabilitatea lor de deschidere, eficiența cuplajului energetic între 'gate' şi aminoacizii încărcați electric ce contribuie la deschiderea canalului ionic). Alte explicații plauzibile ale efectelor modulatoare ale subunităților auxiliare, vizibile, mai ales, în experimente de farmacologie, sunt cele conform cărora ele, prin mecanisme de alostericitate, alterează numărul canalelor ionice funcționale care sunt inserate în membrana celulară.

În figurile de mai jos (Fig. 27, 28), prezentăm un exemplu de modulare a proprietăților biofizice şi farmacologice a unui canal de calciu neuronal de către o subunitate auxiliară (β_3).

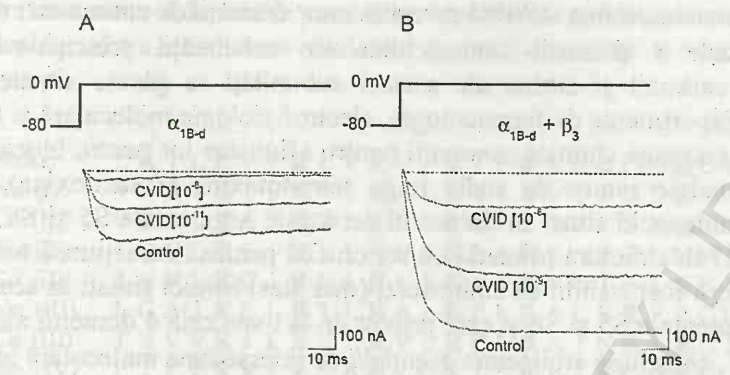


Figura 27 Date experimentale ce exemplifică procesul de modulare a proprietăţilor biofizice şi farmacologice ale unui canal de calciu neuronal de către o subunitate auxiliară (β_3). Reprezentările (A) şi (B) conţin informaţii atât despre efectele modulatoare ale subunităţii β_3 asupra proprietăţilor de permeaţie prin porul principal (α_{1B-d} - de notat creşterea semnificativă a curentului electric prin canalul ionic în prezenţa subunităţii modulatoare β_3), cât şi asupra proprietăţilor farmacologice ale acestui canal ionic (de observat modificarea în sens crescător a concentraţiei de CVID, necesară pentru a obţine 50 % inhibiţie a curentului electric prin canalul ionic atunci când subunitatea modulatoare β_3 este prezentă).

Aplicarea unor algoritmi de modelare moleculară a proprietăţilor de 'împachetare spaţială' (*'folding'*) a canalelor ionice de sodiu au condus la predicţii structurale remarcabile, elaborate chiar înainte de existenţa metodologiei de analiză experimentală a structurii şi funcţiilor canalelor ionice. Astfel, a fost stabilit că fiecare domeniu din cele 4 domenii aminoacidice ale subunităţii principale 'α' este format din 6 domenii transmembranare cu structura secundară de '*α helix*' notate cu S1... S6. De asemenea, a fost prezisă existenţa unui domeniu aminoacidic situat între segmentele S5 şi S6, cu rol în organizarea spaţială a porului canalului ionic, precum şi a unor segmente de aminoacizi cu '*folding*' specific de 'buclă' ('*loop*') care unesc acest domeniu cu segmentele S5 sau S6.

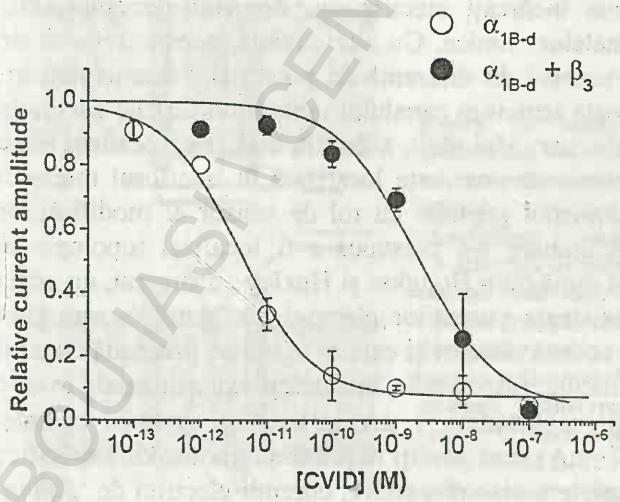


Figura 28 Reprezentarea comprehensivă a efectului de modificare a farmacologiei unui canal de calciu neuronal (α_{1B-d}) mediat de interacţiunea cu toxină CVID, în prezenţa subunităţii modulatoare β_3. Astfel, prezenţa subunităţii modulatoare β_3 conduce la mărirea cu ~ două ordine de mărime a concentraţiei de CVID necesare pentru ca efectul său inhibitor asupra transportului ionic prin canalul ionic studiat să fie de 50 %.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Suplimentar, a fost stabilită prezența unor domenii de aminoacizi de tip '*loop*' care unesc cele 4 domenii aminoacidice ale subunității principale 'α', și că extremitățile carboxil și amino ale acestei subunități se găsesc situate în mediul intracelular. Experimente de farmacologie, electrofiziologie moleculară și mutageneză ce au utilizat compuși chimici cunoscuți pentru afinitatea lor pentru blocarea fluxului ionic prin canalele ionice de sodiu (e.g., tetrodotoxina și saxitoxina), au pus în evidență un aminoacid situat în domeniul ce unește segmentele S5 și S6 (gluatamat, din poziția 387 în structura primară) cu rol crucial pentru interacțiunea toxină – canal ionic. Ulterior, a fost stabilit că aminoacizi (mai ales) acidici situați în acest domeniu, ce unește segmentele S5 și S6 și care provin de la toate cele 4 domenii ale subunității principalè 'α', constituie arhitectura esențială de interacțiune moleculară între toxinele mai sus menționate și canalele ionice de sodiu. Din considerente topologice, aceste regiuni se numesc 'structuri inelare' ('*rings*') și sunt formate din aminoacizii E-E-D-D și D-E-K-A puși în comun de la cele 4 domenii ale subunității principale 'α'. A fost, de asemenea, postulată implicarea acestor aminoacizi în formarea filtrului de selectivitate ionică pentru aceste canale ionice; această supoziție a fost întărită de un rezultat experimental remarcabil, în care aminoacizii D-E-K-A, provenind de la cele 4 domenii ale unui canal ionic de sodiu au fost înlocuiți genetic cu alți aminoacizi ce se găseau în regiunea similară a unor canale ionice de calciu (E-E-E-E), rezultând astfel un canal ionic selectiv pentru ionii de calciu.

Una din observațiile experimentale esențiale ale lui Hodgkin și Huxley a fost dependența puternică de diferența de potențial transmembranar a generării influxurilor celulare nervoase (i.e., a potențialelor de acțiune), fapt ce a sugerat existența canalelor ionice voltaj-dependente ce sunt activate de depolarizarea membranei biologice, și inițiază astfel propagarea potențialelor de acțiune celulare. În urma unor selecții riguroase a tuturor mecanismelor fizice care puteau constitui baza de explicație a fenomenelor experimentale observate, singura explicație acceptată a fost aceea că modificările valorii câmpului electric intermembranar celular produc deplasarea conformațională a unor aminoacizi încărcați electric sau domenii de aminoacizi încărcate electric din structura canalelor ionice. Cu alte cuvinte, aceste domenii de aminoacizi funcționează ca niște senzori de diferență de potențial transmembranar, detectând și apoi transmițând în toată structura canalului ionic modificările survenite în diferența de potențial transmembranar. Mai mult, având în vedere că cea mai mare parte a diferenței de potențial transmembranar este localizată în interiorul miezului hidrofob al biomembranei, acel domeniu peptidic cu rol de senzor al modificărilor diferențelor de potențial transmembranare s-a presupus a fi localizat topologic în interiorul membranei celulare. Însă după cum Hodgkin și Huxley au sugerat, un astfel de scenariu fizic ar presupune existența curenților electrici de '*gating*', care sunt asociați cu deplasările spațiale ale acestor senzori și care ar trebui să preceadă curenții ionici în membranele celulare excitabile. Într-adevăr, în condiții experimentale în care curenții ionici (care sunt mari în magnitudine ~ μA, și deci ar estompa complet vizualizarea curenților de '*gating*' ~ nA) sunt aboliți în prezența unor toxine specifice ce blochează fluxul ionic prin canalele ionice respective, curenții electrici de '*gating*'

ce iau naştere ca urmare a deplasării senzorilor electrici ai canalelor ionice de sodiu în urma unei depolarizări a membranei celulare au putut fi observaţi cu uşurinţă.

Shaker	L A I L R V I R L V R V F R I F K L S R H S K G L Q
Na (I)	V S A L R T F R V L R A L K T I S V I P G L K T I V
Ca (I)	V K A L R A F R V L R P L R L V S G V P S L Q V V L
Na (II)	L S V L R S F R L L R V F K L A K S W P T L N M L I
Ca (II)	I S V L R C I R L L R L F K I T K Y W T S L S N L V
Na (III)	L G A I K S L R T L R A L R P L R A L S R F E G M R
Ca (III)	I S V V K I L R V L R V L R P L R A I N R A K G L K
Na (IV)	P T L F R V I R L A R I G R I L R L I K G A K G I R
Ca (IV)	E S A R I S S A F F R L F R V M R L I K L L S R A E

Figura 29 Comparaţie între secvenţele proteice primare ale domeniilor S4 din canalele ionice voltaj-dependente de sodiu, calciu şi potasiu (*Shaker*). De remarcat prezenţa consistentă în aceste structuri a reziduurilor de aminoacizi bazici (arginina – R – sau lizina – K –) în fiecare a treia poziţie din structurile primare prezentate, fapt ce sugerează un mecanism molecular comun de activare voltaj-dependenţă a acestor canale ionice.

Experimentele de electrofiziologie moleculară au demonstrat că valoarea sarcinii electrice echivalente asociată cu mişcările proteice ce însoţesc şi generează activarea voltaj-dependentă a canalelor ionice de sodiu este de ~ 12 sarcini electronice. Printre alte posibile modele explicative, cea mai acceptată modalitate de explicare moleculară a activării voltaj-dependente a canalelor ionice de sodiu este cea de mişcare efectuată de domeniul S4 sub influenţa modificărilor în diferenţa de potenţial transmembranar – aşa-numitul model 'helix alunecător' ('*sliding helix*').

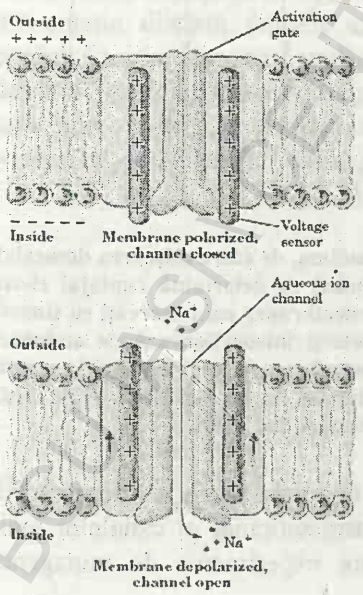


Figura 30 Modul simplificat, ilustrativ, de cuplare mecanicistă a modificărilor conformaţionale date de mişcarea domeniului cu rol de 'senzor' de diferenţa de potenţial ('*voltage sensor*') cu procesul molecular de 'deschidere' al unui canal ionic de sodiu voltaj-dependent. La diferenţe de potenţial transmembranar hiperpolarizante, canalul ionic este, mai ales, în starea moleculară 'închis' ('*closed*'); depolarizarea biomembranei conduce la mişcarea domeniilor '*voltage sensor*', şi prin interacţiuni alosterice cu 'poarta activatoare' ('*activation gate*') se induce modificarea secţiunii transversale de conducţie ionică a proteinei respective, ceea ce permite difuzia ionilor de sodiu (vezi text) (adaptat din D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry,* Fourth Edition, W. H. Freeman, 2004).

În esență, ideea acestui model este următoarea: la diferențe de potențial transmembranare de repaus, negative în citosol, aminoacizii bazici ce sunt încărcați electric pozitiv și localizați pe domeniul S4 (Fig. 29) sunt menținuți în stare de echilibru metastabil în miezul hidrofob al biomembranei, prin intermediul interacțiunii lor electrostatice cu aminoacizi acidici. În urma depolarizării locale a membranei celulare, aceste reziduuri de pe domeniul S4 părăsesc starea de echilibru metastabil, mișcându-se spre partea extracelulară a biomembranei; domeniul S4 se presupune a executa o mișcare spiralată, rotindu-se cu aproximativ 60° și translându-se, în același timp, cu aproape 5-20 Å (Figs. 30, 31). Așadar, domeniile de aminoacizi S4 pot fi asimilate cu senzori moleculari sensibili la modificări de diferență de potențial transmembranară; aceste mișcări secvențiale au loc în toți cei patru monomeri ai subunității principale a canalului ionic, conducând la deocluzia 'porții' canalului ionic, în final, la deschiderea canalului ionic. Din punct de vedere al cineticii moleculare, este foarte important de făcut distincție între procesele moleculare ce corespund modificărilor de structură terțiară ale unui canal ionic voltaj-dependent în urma modificărilor de potențial transmembranar, mediate de senzorii moleculari S4, și tranzițiile canalului ionic între stările 'închis' și 'deschis', mediate de cinetica 'porții' canalului ionic. Teoretic, la orice valoare a diferenței de potențial transmembranar se pot observa tranziții stochastice între stările 'închis' și 'deschis'; însă pentru majoritatea canalelor ionice voltaj-dependente, tranzițiile canalului ionic între stările 'închis' și 'deschis' sunt foarte mult influențate de modificările de structură proteică terțiară ce survin ca urmare a deplasărilor geometrice a domeniilor S4, în urma depolarizării membranare.

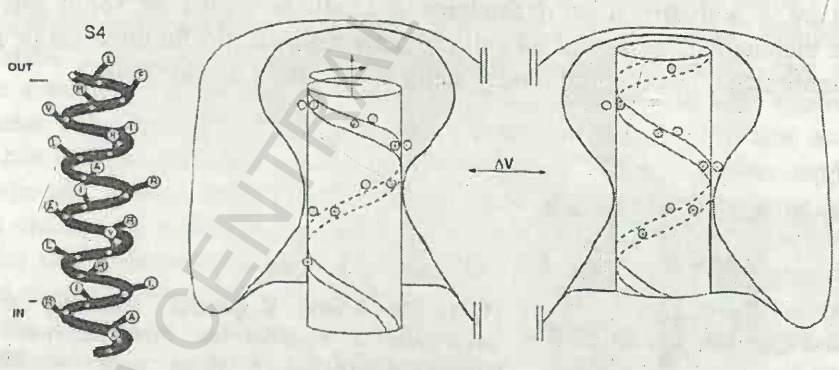


Figura 31 Activarea voltaj-dependentă a canalelor ionice de sodium, de către mișcarea domeniului aminoacidic S4. Aminoacizii încărcați electric pozitiv (arginina) ce determină cuplajul electric dintre acest domeniu și modificări ale câmpului electric intermembranar sunt marcați cu simbolul specific 'R'. În starea de echilibru metastabil, acești aminoacizi interacționează cu aminoacizi acidici de pe domeniile S2 și S3; în urma unei depolarizări membranare, segmentul S4 execută o mișcare spiralată, rotindu-se cu aproximativ 60° și translându-se, în același timp, spre mediul extracelular cu aproape 5-20 Å (adaptat din W. A. Catterall, *Neuron*, 26, 2000).

Prima dovadă experimentală concretă ce a favorizat ideea că domeniul S4 funcționează ca senzor de diferențe de potențial transmembranar al canalelor ionice voltaj-dependente de sodiu a parvenit în urma unor experimente de mutageneză

cuplate cu măsurători de electrofiziologie. Astfel, s-a stabilit că neutralizarea aminoacizilor încărcaţi electric pozitiv din structura primară a segmentului S4 al primului domeniu din structura subunităţii principale 'α' conduce la reducerea semnificativă a sensibilităţii canalului de sodiu la modificări ale diferenţei de potenţial transmembranar, precum şi la o deplasare pe axa diferenţei de potenţial, spre sensul pozitiv, a valorii la care conductanţa acestor canale ionice mutante are valoarea ½ din cea maximă. Aceste rezultate erau postulate ca fiind posibil de observat în urma oricărei alterări a valorii sarcinii electronice asociate cu mişcările proteice ce însoţesc şi generează activarea voltaj-dependentă a canalelor ionice de sodiu voltaj-dependente.

Pe de altă parte, mişcarea spre mediul extracelular a segmentelor S4 din structura canalelor ionice voltaj-dependente de sodiu a putut fi detectată direct, în urma unor experimente extrem de ingenioase de mutageneză şi modificări covalente a acestor proteine. Prin utilizarea unor canale ionice de sodiu mutante, în care o parte din aminoacizii bazici de pe domeniul S4 au fost substituiţi cu cisteina, s-a putut urmări măsura în care proprietăţile funcţionale ale acestor canale ionice erau alterate de interacţiunea aminoacizilor cisteină cu molecule sulfhidrilice încărcate electric din clasa MTS (*methanethiosulfonate*) adăugate în mediul intra- şi extracelular. Aşadar, s-a putut determina că pe măsură ce diferenţa de potenţial transmembranar devenea depolarizantă, probabilitatea de interacţiune dintre respectivii aminoacizi cisteici şi moleculele sulfhidrilice adăugate în mediul extracelular devenea mai mare, pe când probabilitatea de interacţiune dintre aminoacizii cisteici şi moleculele sulfhidrilice adăugate în mediul intracelular devenea tot mai redusă. Devenea astfel evidentă deplasarea spaţială efectivă a domeniilor S4 mutante în urma depolarizării transmembranare, care să explice modularea voltaj-dependentă a ratelor de reacţie dintre aminoacizii cisteici şi reactivii din clasa MTS.

Un alt proces cinetic extrem de important pentru dinamica acestor canale ionice voltaj-dependente, este reprezentat de inactivarea lor; acest proces molecular este cinetic distinct faţă de activarea voltaj-dependentă şi corespunde tranziţiilor canalului ionic spre stări moleculare distincte, în comparaţie cu stările 'închis' sau 'deschis'. Astfel, după activare şi cuplată cu aceasta, canalele ionice voltaj-dependente intră într-o stare neconductivă, diferită topologic de starea sa 'închis' ce este evidenţiată, mai ales, în lipsa depolarizării membranare.

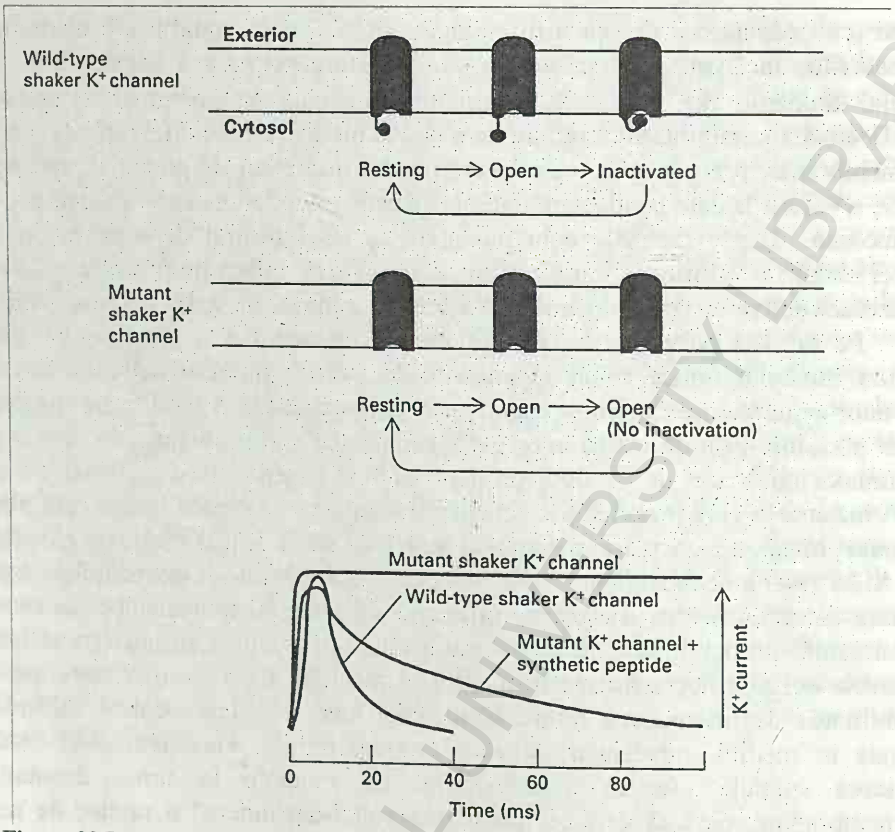


Figura 32 Reprezentarea sumarizată a experimentului ce susține ipoteza '*ball-and-chain*' de inactivare a canalului de potasiu voltaj-dependent (vezi text).

Unul din cele mai elegante modele capabile să explice procesul de inactivare este cunoscut în literatură sub denumirea de modelul '*ball-and-chain*'. În conformitate cu acest model (Fig. 32), un domeniu citoplasmatic al canalelor ionice voltaj-dependente de sodiu ('*ball*'), legat de canalul ionic printr-o peptidă ('*chain*') se mișcă (difuzează) în mediul citoplasmatic și imediat ce găsește canalul ionic într-o stare moleculară adecvată (i.e., în starea 'deschis') interacționează cu acesta și-l inactivează. În particular și cu relevanța directă și pentru canalele ionice voltaj-dependente de sodiu, merită subliniat că experimente sistematice de mutații genetice punctuale au arătat că primii 42 de aminoacizi de la capătul amino al unui canal ionic voltaj-dependent de potasiu (tip '*Shaker*') sunt direct implicați în acest proces de inactivare (ei ar constitui acel '*ball*'); această concluzie a fost stabilită în urma observației că aceste canale ionice nu s-au mai inactivat în urma eliminării genetice din structura primară a acestui canal ionic a celor 42 aminoacizi. Mai mult chiar, atunci când o peptidă sintetică și care conține primii 20 din cei 42 aminoacizi se aplică exogen în mediul citoplasmatic al canalului ionic mutant genetic (cum s-a arătat mai sus), procesul de inactivare se restabilește (Fig. 32). Experimente extensive de mutageneză cuplate cu elaborarea de anticorpi specifici pentru un domeniu '*loop*' întâlnit cel mai frecvent în structura canalelor ionice de sodiu, și care conectează domeniile 3 și 4 ale

subunităţii principale 'α', au demonstrat că respectivul domeniu de aminoacizi formează structura porţii de inactivare a acestor canale ionice (Fig. 33). Suplimentar, prin eliminarea acestui domeniu din structura primară a acestor canale ionice de sodiu voltaj-dependente studiate, s-a observat eliminarea într-o măsură foarte mare a procesului de inactivare, fapt ce subliniază implicarea respectivilor aminoacizi în procesul de inactivare studiat.

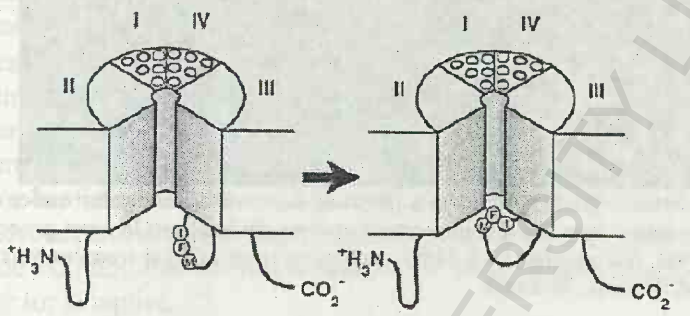


Figura 33 Modul simplificat de inactivare al canalelor ionice de sodiu voltaj-dependente; '*loop*'-ul intracelular ce conectează domeniile 3 şi 4 formează o parte constitutivă a porţii de inactivare al acestor canale ionice, iar în partea dreaptă a acestei figuri este arătat unul din aminoacizii esenţiali (phe-1489) ce este implicat în ocluzia părţii intracelulare a porului permeant al canalului ionic exemplificat în cursul procesului de inactivare descris în text (adaptat din W. A. Catterall, *Neuron*, 26, 2000).

Pentru identificarea specifică a aminoacizilor direct implicaţi în procesul de inactivare şi care se găsesc în structura primară a domeniului '*loop*' ce conectează domeniile 3 şi 4 ale subunităţii principale 'α', s-a recurs iarăşi la experimente de mutageneză. Astfel, a fost demonstrat că un trio de aminoacizi hidrofobi (izoleucina, fenilalanina şi metionina) sunt de o importanţă vitală pentru întregul proces macroscopic de inactivare a canalelor ionice de sodiu. Experimente extrem de elegante, au demonstrat suplimentar că peptide solubile în apă ce conţin aceşti aminoacizi în structura primară sunt capabile să inducă procese de inactivare pentru canalele ionice de sodiu ce au fost concepute genetic, în aşa fel încât să nu posede această proprietate. Cu ajutorul metodelor spectroscopice de rezonanţă magnetică nucleară multidimensională, s-a determinat şi structura tridimensională a domeniului inactivator al canalelor ionice de sodiu. Rezultatele acestor măsurători au evidenţiat o structură secundară de '*α helix*' relativ scurtă, ce este mărginită la capătul amino- de trioul de aminoacizi hidrofobi izoleucina (iso 1488), fenilalanina (phe 1489) şi metionina (met 1490) (Fig. 34). De asemenea, aminoacidul treonina (thr 1491) din vecinătatea celorlalţi trei aminoacizi hidrofobi mai sus amintiţi s-a dovedit a fi implicat în procesul de inactivare.

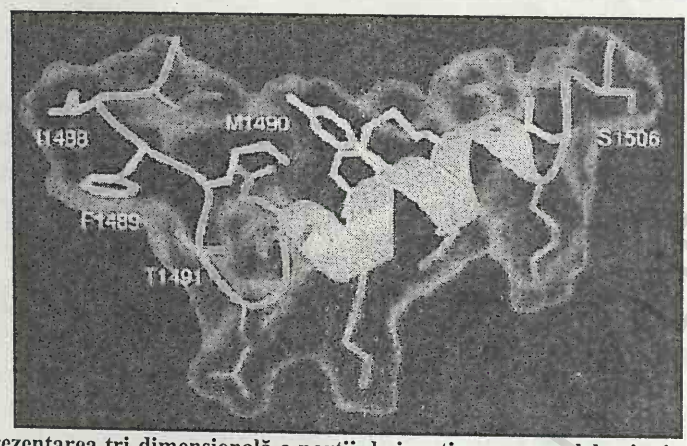


Figura 34 Reprezentarea tri-dimensională a porții de inactivare a canalelor ionice de sodiu voltaj-dependente, cu evidențierea celor mai importanți aminoacizi implicați în acest proces de inactivare: izoleucina (iso 1488), fenilalanina (phe 1489), metionina (met 1490) și treonina (thr 1491) (adaptat din *W. A. Catterall, Neuron, 26, 2000*).

O altă etapă de studiu științific esențială pentru elucidarea mecanismelor moleculare a procesului de inactivare a canalelor ionice de sodiu voltaj-dependente a fost identificarea situsului molecular de interacțiune, cu rol de receptor pentru domeniul inactivator al acestor canale ionice. În acest sens, tot prin intermediul experimentelor de mutageneză au fost identificați aminoacizi cu rol cheie pentru constituirea moleculară a acestui receptor, incluzând aici aminoazici hidrofobi situați la capătul intracelular al segmentelor S6 din domeniul 4, aminoacizi situați în structura primară a '*loop*'-ului intracelular ce conectează segmentele S4 și S5 din domeniul 3, precum și a '*loop*'-ului ce conectează segmentele S4 și S5 din domeniul 4 al subunității principale 'α'. În acest sens, înlocuirea punctuală a oricăror din aceşti aminoacizi s-a constatat a destabiliza existența stării inactivate a canalului ionic de sodiu.

Revenind în finalul acestui capitol la căile moleculare de alterare controlată a proprietăților cinetice și de conducție ionică a canalelor ionice de sodiu, menționăm că pe lângă procesele modulatoare exercitate de subunitățile auxiliare 'β' asupra proprietăților biofizice ale canalelor ionice voltaj-dependente de sodiu, s-a demonstrat și existența unor procese biochimice de fosforilare ce sunt implicate direct în aceste procese celulare. Doar pentru exemplificare, menționăm că studii biochimice și biofizice realizate pe canale ionice de sodiu izolate din creier au demonstrat existența unui proces de fosforilare a acestora de către protein-kinase cAMP-dependente, ce conduce la reducerea conductanței lor electrice. Suplimentar, s-a determinat că procesele de fosforilare mai sus amintite, mediate specific de protein-kinasa A (PKA) au loc în patru situsuri particulare, situate pe '*loop*'-ul intracelular ce unește domeniile 1 și 2 din structura subunității principale 'α' a canalelor ionice de sodiu neuronale. Procesele de fosforilare inițiate în aceste locuri conduc la diminuarea valorii maximale a curenților ionici de sodiu mediați de aceste canale ionice, fără însă a afecta cinetica voltaj-dependentă de activare și, respectiv, inactivare a lor. Procesele de fosforilare a canalelor ionice de sodiu s-au dovedit a fi inițiate și de o altă enzimă specifică,

protein-kinasa C (PKC); activarea acestei enzime de către diacilglicerol sau de către acetilcolină ce acţionează prin intermediul receptorilor muscarinici specifici, conduce la diminuarea proceselor cinetice de inactivare, precum şi la micşorarea curenţilor maximali mediaţi de canalele ionice de sodiu. Specific, procesele cinetice de inactivare sunt afectate drept urmare a fosforilării PKC-dependente a unui aminoacid serina din domeniul responsabil pentru acest fenomen de inactivare (ser 1506 – vezi Fig. 34), iar diminuarea valorii maximale a curentului ionic de sodiu este cauzată de fosforilarea unor aminoacizi situaţi pe '*loop*'-ul intracelular ce uneşte domeniile 1 şi 2 din subunitatea principală 'α'. Trebuie menţionat faptul că procesele de fosforilare PKC-dependente şi depolarizarea transmembranară cauzată de fluxurile ionice mediate de canalele ionice de sodiu, concură la potenţarea proceselor de fosforilare PKA-dependente, dând astfel naştere la un proces de modulare convergentă a funcţiei şi proprietăţilor biofizice a canalelor ionice de sodiu. Relevanţa fiziologică a acestor fenomene interconectate cauzal şi funcţional rezidă în posibilitatea de neuro-modulare a proprietăţii de excitabilitate a celulelor neuronale, în funcţie de modificările continue ale activităţilor lor sinaptice.

2.3 Porinele: proteine specializate cu rol în transportul de substanţă prin biomembrane

Sistemele proteice descrise anterior ce facilitează transportul de ioni prin biomembrane sunt extrem de specifice pentru anumite specii ionice. Aşa după cum am menţionat anterior, există mecanisme de transport celular transmembranar nespecifice ce facilitează transportul net masic, restricţionat, mai ales, de o limită superioară a masei moleculare a moleculelor transportate şi nu de sarcina electrică netă a respectivelor molecule. O asemenea clasă de transportori proteici denumită generic porine, este întâlnită în membrana externă a bacteriilor Gram-negative şi a mitocondriilor. Aşa după cum este ştiut, din convenienţă, bacteriile sunt clasificate ca fiind Gram-pozitive sau Gram-negative, în funcţie de răspunsul dat prin interacţiune cu reactivul Gram. În ciuda diferenţelor structurale substanţiale, aproape toate bacteriile au un perete protectiv compus din peptide şi polizaharide denumit peptidoglican. La bacteriile Gram-pozitive, peretele protectiv de peptidoglican este relativ gros (~ 25 nm) şi circumscrie biomembrana bacterială plasmatică; la bacteriile Gram-negative, acest perete protectiv este mai subţire (~2-3 nm) şi este constituit dintr-un singur strat de peptidoglican ce ocupă interspaţiul dintre biomembrana externă şi internă a acestor bacterii (Fig. 35). Astfel, spre deosebire de bacteriile Gram-pozitive, bacteriile Gram-negative – cu reprezentantul lor cel mai cunoscut, *E. coli* – prezintă două formaţiuni concentrice de bistraturi lipidice ce delimitează între ele spaţiul periplasmic. Cu toate că ambele biomembrane au structura clasică de lipide şi proteine integrale implicate în transferul de materie şi informaţie, există între ele deosebiri biochimice şi funcţionale notabile.

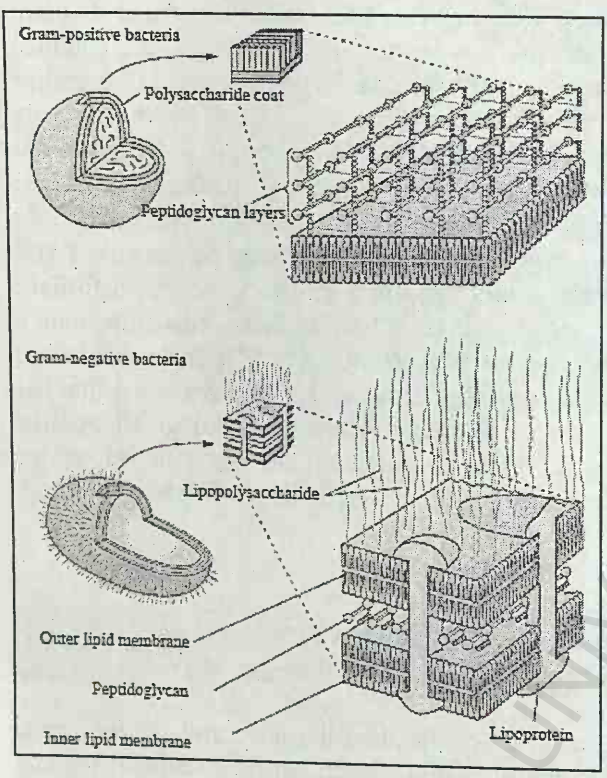


Figura 35 Modul general de organizare al bacteriilor Gram-pozitive şi Gram-negative, cu evidenţierea principalelor elemente de structură: membrana de peptidoglican (*'peptidoglycan layer'*), membranele celulare externe (*'outer lipid membrane'*) şi, respectiv, interne (*'inner lipid membrane'*) şi stratul de lipopolizaharide (*'lipopolysaccharide'*) (adaptat din *www*).

Astfel, biomembrana internă este compusă aproape exclusiv din fosfolipide (70-80 % fosfatidiletanolamină, fosfatidilglicerol şi cardiolipin) ce sunt distribuite aproape egal între cele două monostraturi. Biomembrana externă este, în schimb, asimetrică, în sensul că monostratul lipidic intern are compoziţie biochimică similară cu cea a biomembranei interne, iar monostratul exten este compus, în principal, din lipopolizaharide sau lipooligozaharide. În ceea ce priveşte particularitatea funcţională a biomembranelor externe, trebuie amintit faptul că acestea sunt mult mai permeabile pentru apă şi ioni decât biomembranele interne, datorită prezenţei unor proteine integrale specifice. Cu toate că funcţia esenţială a membranei externe a bacteriilor Gram-negative este de a asigura protecţia acestora împotriva agenţilor distructivi din mediul extern, proteinele asociate cu aceasta contribuie decisiv la implementarea unor procese moleculare esenţiale pentru fiziologia bacteriei respective, cum ar fi: translocarea prin biomembrană a diverşilor soluţi, proteine, nutrienţi, antibiotice. Spre deosebire de alte clase de proteine membranare integrale cu rol în transport de substanţă, proteinele din membrana externă a bacteriilor Gram-negative au structura secundară de '*β sheet*' şi nu '*α helix*'. În ultimii ani, numeroase experimente de cristalografie cu raze X şi microscopie electronică au facilitat descifrarea structurii atomice a câtorva proteine din membrana externă a bacteriilor Gram-negative, şi care au fost astfel clasificate în şase familii: OmpA, OmpX, fosfolipaza A, porine generale (nespecifice) OmpF şi PhoE, porine specifice LamB şi ScrY şi transportorii din familia TonB (FhuA şi FepA). Trebuie menţionat că porinele din membrana externă a

bacteriilor Gram-negative sunt, se pare, printre foarte puţinele exemple de proteine membranare cu rol de transport de substanţă care au structura secundară de '*β sheet*', în loc de '*α helix*'. Printre motivele esenţiale ale acestei alegeri făcute în cursul evoluţiei naturale, se numără şi cel al 'economisirii genetice'; astfel, pentru a se realiza un domeniu peptidic transmembranar cu structura de '*α helix*' este nevoie de 21-25 aminoacizi, pe când un domeniu '*β sheet*' necesită doar 9-11 aminoacizi. În acest fel, o cantitate bine-definită de 'litere' genetice (exoni) poate compune mai multe 'cuvinte' (segmente peptidice transmembranare) alegându-se modele de structură secundară de tip '*β sheet*'. În acest caz, segmentele '*β sheet*' pot prezenta grupări chimice hidrofobe şi hidrofile provenind de la aminoacizii constituienţi, care să le asigure stabilitate energetică în interiorul membranelor şi care să permită difuzia pasivă a moleculelor hidrofile prin proteinele astfel constituite. Este interesant de remarcat faptul că pori transmembranari cu structura secundară de '*β sheet*' sunt întâlniţi şi în cazul unor toxine microbiene – aşa-numitele '*pore-forming toxins*', ce sunt reprezentate cel mai bine de homo-heptamerul α-hemolysin care provine de la bacteria *S. aureus*.

În cele ce urmează, vor fi prezentate detalii structurale şi funcţionale ale porinelor, care aparţin clasei de proteine transmembranare din membrana externă a bacteriilor Gram-negative implicate în transportul pasiv de substanţă. Structura terţiară a unui monomer este relativ simplă; astfel, monomerii acestor porine sunt alcătuiţi din polipeptide formate din 300 până la 420 de aminoacizi şi care generează 16 până la 18 domenii cu structura secundară anti-paralelă de '*β sheet*'.

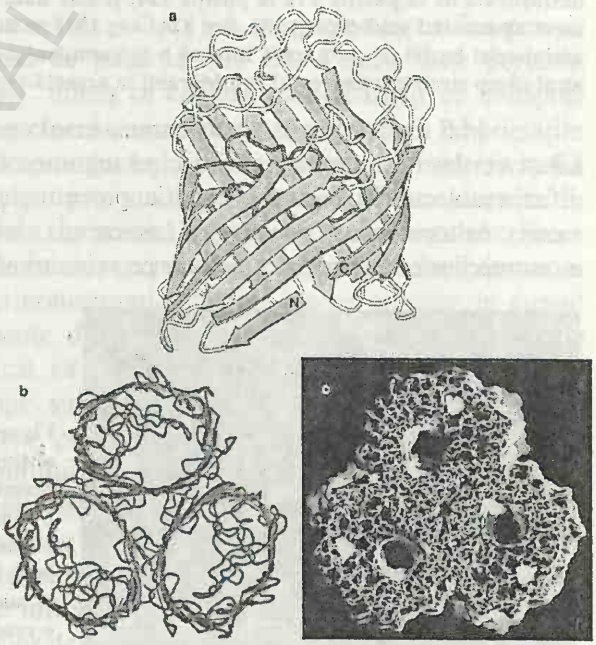


Figura 36 (a) Structura terţiară a unui monomer din structura porinei OmpF de la bacteria *E. coli*; aranjamentul antiparalel a 16 structuri secundare de tip '*β sheet*' ce sunt inter-conectate prin intermediul unor domenii specifice de aminoacizi generează un por transmembranar permeant. Un domeniu de aminoacizi ce uneşte, în mediul intracelular, structurile secundare '*β sheet*' 5 şi 6 se extinde în interiorul porului permeant al porinului şi este reprezentat mai contrastat. (b) Reprezentarea schematică a trimerului OmpF, aşa cum este observat din mediul extracelular (c) Secţiune transversală realizată la mijlocul porinei OmpF, în care este ilustrată secţiunea transversală a celor 3 monomeri cu un diametru de ~ 1.2 nm (adaptat din www).

Trei asemenea structuri monomerice formează o structură proteică cu structură cuaternară de trimer, deosebit de stabilă şi care poate fi disociată în componentele

monomerice doar după denaturare. Toate porinele a căror structură 3D a fost elucidată prezintă în interiorul monomerilor componenți un segment de aminoacizi (L3) ce constituie legătura între domeniile 5 și 6 '*β sheet*' adiacente, și care este atașat prin intermediul unor legături de hidrogen de partea internă a monomerilor. Acest domeniu L3 ('*loop*') contribuie decisiv la modularea proprietăților de transport prin monomeri, cum ar fi stabilirea limitei superioare de masă a moleculelor ce pot traversa porul (Fig. 37).

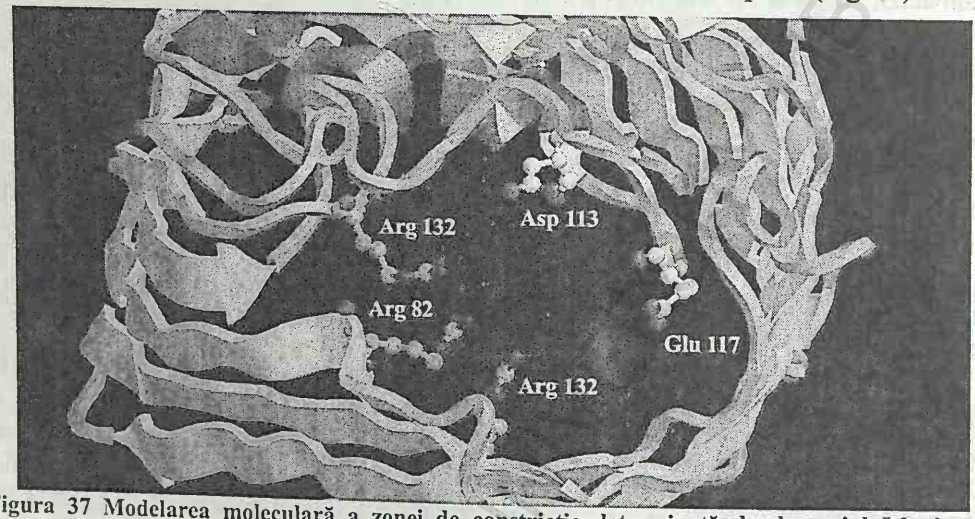


Figura 37 Modelarea moleculară a zonei de constricție determinată de domeniul L3 al unui monomer din structura porinei OmpF. Secvența primară de aminoacizi a acestui domeniu este desfășurată de la poziția 112 la poziția 121, și este dată de aminoacizii TDMLPEFGGD. Prezența unor aminoacizi acidici (arg 132, arg 82 și arg 132) pe domeniul L3 în imediata proximitate a unor aminoacizi bazici de pe partea internă a monomenului (asp 113 și glu 117) conduce la generarea unui câmp electric transversal considerabil în această regiune specifică a porului permeant.

Mai mult, câmpul electric transversal ce există între aminoacizii acidici de pe L3 și cei bazici, orientați simetric pe regiunea interioară a porilor afectează esențial difuzia moleculelor încărcate electric, precum și proprietățile de selectivitate ionică. În cazul maltoporinelor există trei asemenea segmente ce se găsesc în interiorul monomerilor componenți ai acestor proteine transportoare.

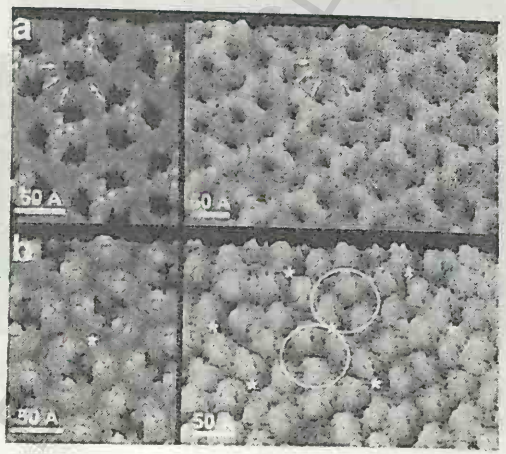


Figura 38 Reprezentare de înaltă rezoluție obținută din înregistrări de microscopie de forță atomică (*atomic force microscopy*) a aranjării bidimensionale a porinelor OmpF în forma cristalină, obținute la un pH de 7.8 și tărie ionică 0.3 M KCl (partea din dreapta), precum și modelarea la nivel atomic a acestor porine, la o rezoluție de 3 Å (partea din stânga). În panelul (a) este arătată vederea din mediul intracelular al acestor porine, iar în panelul (b) vederea din mediul extracelular (adaptat din *www*).

Porinele sunt clasificate în două mari categorii: (a) nespecifice (sau generale), care prezintă o relaţie de dependenţă liniară între fluxul moleculelor translocate şi gradientul de concentraţie al respectivelor molecule şi (b) specifice, care facilitează transportul pasiv, mai ales, pentru anumiţi soluţi şi pentru care există o relaţie de tip Michaelis-Menten ce descrie procesele de transport mediate.

Tabel 3 Proprietăţi generale ale unor porine bacteriene nespecifice.

Porine şi sursa lor bacterială	Diametrul porului (nm)	Limita de excluziune masică (Da)
E. coli		
OmpF	1.2	
OmpC	1.1	600
PhoE	1.2	
P. aeruginosa		
F	2.2	6000

2.3.1 Porine nespecifice

Cu o secţiune transversală minimă de ~ 7 x 11 Å, porinele nespecifice permit difuzia moleculelor hidrofile cu masa de până la 600 Da. Pentru toate porinele nespecifice cunoscute, domeniul '*loop*' intern ce conferă particularităţi de transport molecular şi ionic este cel ce interconectează domeniile '*β sheet*' 5 şi 6. Proprietăţile de permeaţie ale porinelor nespecifice, incluzând aici conductanţa şi selectivitatea ionică, se pot caracteriza cel mai eficient prin studierea proprietăţilor lor electrice în sisteme de membrane lipidice artificiale. În această situaţie, experimentatorul trebuie să ţină seama de faptul că mărimile de interes (conductanţa porinei şi selectivitatea sa ionică) sunt dependente de natura şi concentraţia soluţiei ionice utilizate în cursul experimentelor. Numeroase experimente de mutageneză corelate cu măsurători de electrofiziologie moleculară au indicat că proprietatea de selectivitate a porinelor nespecifice – porinele din clasa OmpF sunt uşor cation-selective, pe când cele din clasa PhoE sunt uşor anion-selective – poate fi alterată de modificările impuse în starea de încărcare electrică a interiorului porului, dată de prezenţa aminoaicizilor bazici şi acidici. În cazul porinelor din clasa PhoE, substituirea unui aminoacid lisina cu unul glutamat din zona de constricţie impusă de domeniul L3 conduce la un fenomen de schimbare a selectivităţii porinei, de la uşor anion-selectiv, la uşor cation-selectiv. Alte studii de interes au vizat influenţa exercitată de compoziţia biochimică a bistraturilor lipidice asupra proprietăţilor de permeaţie prin porine nespecifice. Aşadar, a fost demonstrat că pentru porinele din *P. denitrifican*, conductanţa acestora este aceeaşi în cazurile în care bistratul lipidic în care sunt încorporate este format doar din

fosfolipide (bistrat simetric) sau din fosfolipide şi lipopolizaharide (bistrat asimetric); cu toate acestea, inserţia porinelor purificate din *P. denitrifican* este mult facilitată de bistratul lipidic asimetric.

Studii de electrofiziologie moleculară realizate pe porinele nespecifice OmpF inserate în membrane lipidice artificiale au vizat influenţa exercitată de modificarea pH-ului soluţiei apoase. Motivaţia naturală a acestor experimente derivă din faptul că starea de încărcare electrică a porinelor studiate depinde de valoarea concentraţiei ionilor de hidrogen din soluţie, prin aceea că reacţiile de protonare-deprotonare ale aminoacizilor bazici şi acidici din interiorul porului sunt pH-dependente. Astfel, la valori acide ale pH-ului soluţiei apoase, a fost demonstrat că valoarea conductanţei porinei OmpF creşte de trei ori când pH-ul este modificat de la valoarea 1 la valoarea 5. În regiunea uşor acidică spre uşor bazică a pH-ului soluţiei externe (pH = 5 – 9), conductanţa porinei studiate este relativ neschimbată, iar modificând pH-ul soluţiei externe în domeniul bazic (pH = 9 – 12) conductanţa porinei creşte cu până la 15 – 30 %. În ceea ce priveşte proprietatea de selectivitate ionică, a fost demonstrat că în domeniul de pH de la 5 la 9, porinele din clasa OmpF sunt uşor cationi-selective ($P_+ \sim 3P_-$), iar în domeniul de pH de la 9.5 la 12 selectivitatea cationică creşte uşor. În contrast, în soluţii acide (pH <= 3.5) OmpF-ul devine uşor anion-selectiv şi la pH = 2, $P_- \sim 3P_+$ (Fig. 39).

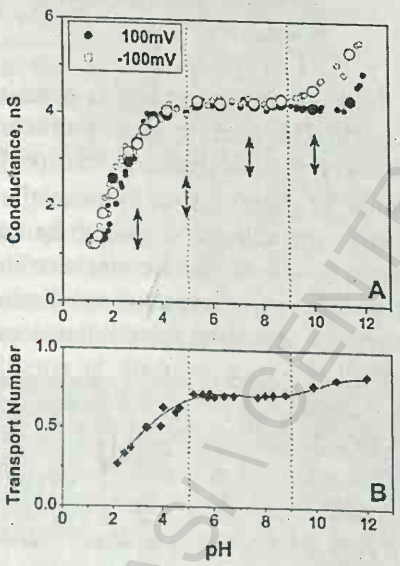


Figura 39 Dependenţa de pH a conductanţei (a) şi a selectivităţii ionice (b) a porinelor OmpF inserate în membrane lipidice artificiale simetrice formate din 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine. Datele din panelul (a) obţinute la diferenţe de potenţial aplicate de + 100 mV (cercuri pline) şi, respectiv, – 100 mV (cercuri goale), pun în evidenţă un proces de rectificare ionică, în sensul că la pH-uri bazice, conductanţa porinelor este mai mare atunci când potenţialul electric în compartimentul unde a fost introdusă proteina studiată este negativ. După cum se observă din panelul (b), în regiunea de pH cuprinsă între 5 şi 9, porina OmpF este uşor cationic-selectivă, iar în domeniile puternic acide şi, respectiv, puternic bazice, această porină este mai ales anion- şi respectiv cation-selectivă. Termenul *'transport number'* reprezintă o mărime adimensională, proporţională cu permeabilitatea cationilor prin porină (adaptat din E. M. Nestorovich et al, *Biophys. J.* 85, 2003).

Din punct de vedere fizic, alterările de conductanţă şi selectivitate ionică ale porinelor studiate induse de modificări controlate ale pH-ului şi tăriei ionice a soluţiei apoase externe, pot fi abordate teoretic prin prisma fenomenelor de inversiune a semnului sarcinii electrice totale din interiorului porului proteinei studiate, precum şi a celor de ecranare electrică a sarcinilor electrice fixe, din structura proteinei, de către ionii din soluţia apoasă. O abordare judicioasă a acestor procese, interconectate cu influenţa exercitată asupra fenomenelor de transport, poate fi realizată prin formalismul

Nernst-Poisson–Planck ce va fi prezentat ulterior în această carte. Studiul mecanismelor de permeaţie moleculară prin porine nespecifice şi, în special, prin OmpF, este de un deosebit interes pentru industria farmaceutică, deoarece există tot mai multe rezultate experimentale care sugerează că principala cale de acces prin difuzie a antibioticelor din clasa β-lactam în interiorul bacteriilor *E. coli* este dată de porinele OmpF. Aşa după cum este cunoscut, compuşii antibiotici din clasa β-lactam formează una din cele mai importante familii de agenţi antibacterieni. Doar în câteva cuvinte, eficienţa antibacteriană a acestor antibiotice este strâns corelată cu abilitatea lor de a interfera cu biosinteza celulară a stratului de peptidoglican, şi are la bază similaritatea structurală, moleculară, dintre acestea şi substratul pentru o clasă de enzime specifice (*DD-transpeptidases*) din spaţiul periplasmatic; astfel, inhibiţia acestor enzime de către compuşii antibiotici din clasa β-lactam conduce la instabilitatea structurală şi, ulterior, moartea bacteriilor astfel 'contaminate'. Doar ca să amintim aici câteva din aceste rezultate, trebuie menţionat că experimente realizate *in-vivo* arată că o parte din bacteriile *E. coli* rezistente la antibioticele din clasa β-lactam prezintă deficienţe de exprimare a OmpF-ului în membrana externă; suplimentar, a fost demonstrat că alterarea structurii primare a regiunii peptidice L3 de interconectare între domenii '*β sheet*' învecinate din structura porinei OmpF modifică sensibilitatea bacteriilor pentru antibiotice. Abia rezultatele de electrofiziologie moleculară, ce au constat în reconstituirea porinelor OmpF în membrane lipidice artificiale şi studierea modificărilor de conductanţă electrică ale acestora la nivel de moleculă individuală, cu rezoluţii temporale de ordinul milisecundelor, au demonstrat că ampicilina împreună cu alte peniciline şi cefalosporine interacţionează puternic cu reziduuri aminoacidice din zona de constricţie (L3) a porinelor OmpF. Suplimentar, rezultate derivate din modelări moleculare susţin ideea că existenţa unei complementarităţi între distribuţia de sarcină electrică a moleculei de ampicilină şi cea din zona de constricţie a porinelor OmpF facilitează translocarea eficientă, prin intermediul interacţiunilor electrostatice favorabile, a acestor antibiotice în *E. coli*. Tot în acest sens, este cunoscut de mai mult de un deceniu că prin comparaţie cu cefalosporinele şi penicilinele monoanionice, bacteriile *E. coli* sunt de aproape 50-60 ori mai permeabile pentru antibioticele zwiterionice din clasa ampicilinei; de aceea, în multe situaţii, ampicilina este medicamentul preferat pentru diminuarea infecţiilor provocate de *E. coli*. Mai specific, este sugerat că starea de conformaţie energetică stabilă existentă între molecula de ampicilină şi zona de constricţie a porinei OmpF este datorată, pe de o parte, interacţiunilor electrostatice ce se stabilesc între gruparea acidică a ampicilinei şi cei trei aminoacizi bazici din interiorul porului (arg-132, arg-82 şi arg-42), iar pe de altă parte, interacţiunii dintre gruparea amoniu din structura ampicilinei şi aminoacidul glu-117 din zona constrictivă a porului (Fig. 40). Suplimentar, gruparea fenil din structura ampicilinei este stabilizată energetic de interacţiunea hidrofobă cu aminoacizii tyr-32, tyr-22 şi phe-118 din structura primară a porinei OmpF.

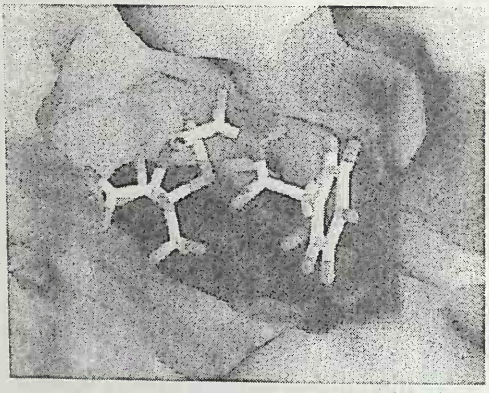


Figura 40 Modelarea moleculară a interacțiunii dintre ampicilină și regiunea constrictivă a unui monomer al porinei OmpF. Datorită caracterului electric zwiterionic, ampicilina interacționează electrostatic, simultan, cu aminoacizii bazici și acidici din această regiune specifică (L3-vezi mai sus); astfel, gruparea carboxilat a ampicilinei interacționează cu regiunea încărcată electric pozitiv a zonei de constricție (colorată în albastru – stânga-jos), iar gruparea sa amoniu interacționează cu regiunea încărcată electric negativ a zonei de constricție (colorată în roșu – dreapta-sus) (adaptat din *www*).

În figura de mai jos (Fig. 41), sunt prezentate rezultate experimentale ce sugerează maniera în care sunt studiate, la nivel de singură moleculă, interacțiunile dintre molecula de ampicilină și porinele din clasa OmpF.

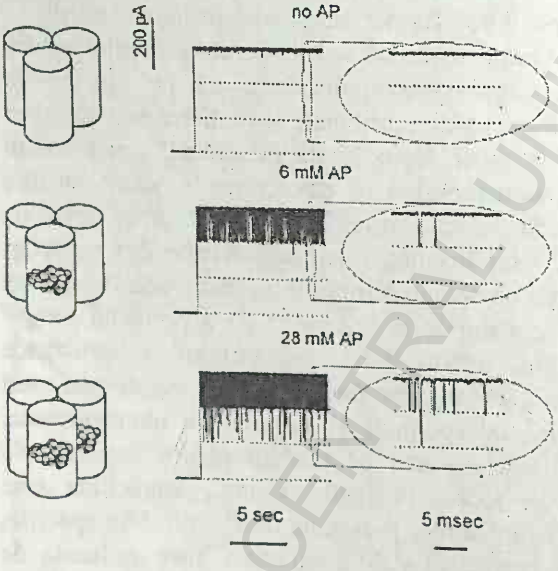


Figura 41 Rezultate experimentale ce indică modificările de conductanță electrică a monomerilor de OmpF inserați în membrane lipidice artificiale în prezența interacțiunilor cu ampicilină (AP) – detalii în text (adaptat din *E. M. Nestorovich et al, PNAS 99, 2002*).

Așadar, în lipsa moleculelor de ampicilină din mediul extern și la o diferență de potențial aplicată din exterior optimă, în sensul că porinul se găsește doar în starea cu conductanță maximă, curentul electric mediat de cei trei monomeri din structura cuaternară a OmpF-ului nu prezintă fluctuații de amplitudine (Fig. 41, panelul superior). În prezența moleculelor de ampicilină însă, se poate întâmpla ca una din acestea să difuzeze în interiorul unui monomer din structura OmpF și, mai ales, datorită interacțiunilor electrostatice stabilizatoare (Fig. 41, panelul din mijloc și de jos) timpul de rezidență al acestei molecule de ampicilină în interiorul monomerului va fi finit. Acest lucru este vizibil prin aceea că prezența în interiorul unui monomer din structura OmpF-ului pentru suficient timp, molecula de ampicilină modifică aria

transversală efectivă al acestui monomer şi deci alterează conductivitatea sa electrică, iar aceasta determină apariţia unor fluctuaţii temporale ale valorii amplitudinii curentului electric mediat de porină. Aceste fluctuaţii delimitează temporal momentul în care monomerul de porină interacţionează meta-stabil cu molecula de ampicilină şi cel în care monomerul devine 'gol', în urma difuziei ampicilinei în afara regiunii interne a porinei; evident, aceasta este o altă probă experimentală a interacţiunii reversibile dintre interiorul porinei şi ampicilină. Prin analiza statistică elaborată a acestor fluctuaţii de curent electric (vezi într-un capitol următor), se pot determina constantele de reacţie ale interacţiunii reversibile între molecula de ampicilină şi porină. Din punct de vedere experimental însă, pentru ca o asemenea interacţiune reversibilă să fie vizibilă prin metodologia expusă succint mai sus, trebuie ca cel puţin două condiţii să fie îndeplinite: (a) molecula difuzantă să rămână suficient de mult timp în interiorul porinei – prin implicarea, mai ales, dar nu exclusiv a unor interacţiuni de natură electrostatică, care să diminueze coeficientul de difuzie prin por al acesteia – astfel încât respectivul interval de timp să fie accesibil măsurătorilor cu echipamentul existent şi (b) o dată prezentă în interiorul porinei, molecula difuzantă trebuie să altereze cât mai mult – prin intermediul caracteristicilor sale sterice şi electrice – conductivitatea electrică a porinei, pentru ca această modificare să fie cât mai facil de înregistrat experimental. Un calcul simplu arată că dacă molecula difuzantă nu ar interacţiona specific cu interiorul porinei, şi deci coeficientul său de difuzie în porin ar fi aproximativ similar cu cel din soluţia externă, timpul de rezidenţă în porină în procesul de difuzie liberă ar fi cu mult prea mic pentru a fi rezolvabil experimental. Aşadar, pentru o moleculă cu masa moleculară de ~ 100 Da, coeficientul său de difuzie în apă (D) este de aproape 10^{-5} cm^2/s; din ecuaţia de difuzie a lui Einstein rezultă că, într-o exprimare grosieră, timpul (t) în care molecula respectivă parcurge în cursul procesului de difuzie distanţa (x) este dat de ecuaţia :

$$t = \frac{x^2}{D} \tag{34}$$

Astfel, molecula respectivă ar traversa prin difuzie liberă o distanţă egală cu cea a grosimii unei biomembrane (~ 10 nm) în doar 100 ns ; pentru a putea surprinde experimental un asemenea interval de timp – presupunând că în timpul cât este în interiorul porinei molecula respectivă cauzează o modificare de conductanţă electrică vizibilă cu instrumentele moderne (~pS), frecvenţa de eşantionare a sistemului de achiziţii de date utilizat ar trebui să fie de ordinul zecilor de MHz. Cu toate că există companii care produc sisteme automate de achiziţii de date ce permit eşantionări aşa rapide, cele mai performante amplificatoare de tip '*patch-clamp*', care să facă posibilă vizualizarea unor curenţi electrici de ordinul pico-amperilor, nu permit analiza unor semnale cu frecvenţa mai mare de 100 kHz. Chiar dacă s-ar rezolva problema tehnică cu privire la realizarea unui asemenea echipament hardware, într-un asemenea domeniu de frecvenţe, amplitudinea fluctuaţiilor termale de curent electric din sistem ar fi mult prea mare în comparaţie cu amplitudinea fluctuaţiilor de curent electric prin

porină, mediate de trecerea moleculei difuzante, şi deci urmărirea în timp real a difuziei moleculei studiate prin interiorul porinei ar fi imposibilă. Exemple numerice edificatoare în acest sens vor fi date într-un capitol următor.

Cu ajutorul unor experimente realizate aşa cum s-a descris mai sus şi cum vor fi dezbătute pe larg în capitolele următoare, s-a putut demonstra caracterul, mai ales, electrostatic al interacţiunilor dintre molecula de ampicilină şi interiorul porinei OmpF.

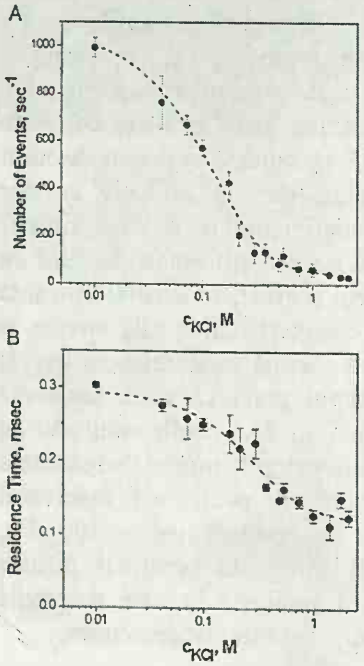


Figura 42 Parametrii cinetici ce descriu interacţiunea dintre ampicilină şi interiorul monomerilor de OmpF, aşa cum variază în funcţie de concentraţia soluţiei electrolitice (KCl) în care au loc aceste interacţiuni (vezi text). Pentru implementarea acestor experimente, porinele au fost inserate în membrane lipidice artificiale, diferenţa de potenţial aplicată a fost de – 100 mV (măsurată din partea în care a fost aplicată proteina OmpF), pH-ul soluţiei a fost 5, iar concentraţia ampicilinei a fost egală cu 5.7 mM (adaptat din *E. M. Nestorovich et al, PNAS 99, 2002*).

Aşadar, dacă interacţiunile descrise sunt de natură electrostatică, modificarea tăriei ionice a soluţiei în care are loc procesul respectiv va altera, prin modificarea razei de ecranare electrostatică Debye, energia de interacţiune electrostatică porină – ampicilină. Modificări ale acestei energii de interacţiune pot fi evidenţiate prin alterarea timpilor medii de rezidenţă a moleculei de ampicilină în interiorul porinei şi a frecvenţei evenimentelor ce sunt asociate cu prezenţa acestei molecule în interiorul porinei, vizibile experimental prin diminuarea conductivităţii sale electrice. După cum este arătat în figura de mai sus (Fig. 42), odată cu scăderea tăriei ionice a soluţiei în care au loc aceste interacţiuni, timpul mediu de rezidenţă (‘*residence time*’) al ampicilinei în OmpF creşte, iar frecvenţa de repetiţie a interacţiunilor de tip ampicilină – porină (‘*number of events*’) creşte şi ea. Odată cu creşterea tăriei ionice, tendinţa pentru mărimile descrise devine inversă. În medii apoase cu tării ionice mici (0.01 M în comparaţie cu 1 M), raza de ecranare Debye creşte şi deci energia de interacţiune (atracţie) electrostatică între ampicilină şi porină va creşte în consecinţă; aceasta poate conduce, aşa cum a fost observat experimental, la mărirea frecării între molecula de ampicilină şi interiorul porinei, la diminuarea, în consecinţă, a coeficientului ei de difuzie prin porină şi deci la mărirea timpului petrecut de ampicilină în porină, în

cursul difuziei sale libere. Suplimentar, mărirea energiei de interacţiune între ampicilină şi porină la tării ionice mici, conduce la favorizarea evenimentelor de obstrucţie temporară a OmpF-ului de către ampicilină, şi deci implicit la mărirea frecvenţei de repetiţie a interacţiunilor de tip ampicilină – porină.

În domenii limitate de diferenţe de potenţial externe, porinele nespecifice se comportă, din punct de vedere electric, ca nişte conductori ohmici, particularitate dată de liniaritatea caracteristicii lor curent-tensiune. Peste o anumită valoare de prag a diferenţei de potenţial aplicate, măsurătorile de electrofiziologie moleculară au indicat faptul că porinele nespecifice fluctuează între diferite sub-stări de conductivitate (Fig. 43). Pentru porinele nespecifice din *E. coli*, valoarea tensiunii electrice de prag de la care sunt vizibile procesele cinetice de tranziţie între diferite substări conductive se află între 100 şi 200 mV; pentru comparaţie, pentru porina Omp34 provenind de la *A. delafieldii*, această valoare de prag se află în domeniul 10-20 mV. Cu toate acestea, trebuie menţionat că, în acest caz, măsurătorile s-au realizat la o concentraţie a KCl de 100 mM şi nu de 1 M, aşa cum a fost cazul porinelor izolate din *E. coli*. Numeroase rezultate experimentale au demonstrat faptul că valoarea tensiunii de prag este modulată de pH, tăria ionică a soluţiei în care se desfăşoară experimentele, presiune hidrostatică, prezenţa polizaharidelor, a oligozaharidelor şi a policationilor din soluţia externă. De asemenea, a fost demonstrat că mutaţiile genetice punctuale ale aminoacizilor acidici sau bazici din zona de constricţie modulează fenomenul de voltaj-dependenţă a porinelor nespecifice. Sensibilitatea porinelor nespecifice pentru diferenţele de potenţial aplicate din exterior este cu atât mai mare, cu cât pH-ul soluţiei externe este mai mic, sugerând astfel implicarea directă în procesele de voltaj-dependenţă a aminoacizilor bazici, arginina din zona de constricţie; aceasta este motivată de faptul că la valori ale pH-ului mici, probabilitatea ca arginina să fie ne-disociată de protonul din gruparea sa funcţională este mai mare, iar încărcarea sa electrică va fi, mai ales, pozitivă şi deci energia de interacţiune cu câmpul electric extern va fi mai mare. Surprinzător însă, înlocuirea aminoacizilor arginină cu cisteina din zona de constricţie a porinelor cation-selective OmpF şi anion-selective PhoE a condus la tendinţe opuse în ceea ce priveşte caracteristica de voltaj-dependenţă studiată. Mecanismul molecular al fenomenului de voltaj-dependenţă a porinelor nespecifice nu este însă pe deplin elucidat, cu toate că experimentele de până acum fundamentează ideea că aminoacizii încărcaţi electric din interiorul porinelor respective sunt implicaţi în acest fenomen. Alternativ, a fost propus un fenomen indirect de modificare a ecranării electrostatice în interiorul porului indus de ionii şi moleculele polare, a căror flux este mai mare la diferenţe de potenţial ridicate; astfel, penetrarea porului de către ioni şi molecule polare implică de-hidratarea parţială a acestora. Redistribuţia ulterioară a moleculelor de apă de hidratare şi/sau a ionilor dizolvaţi ar putea contribui la diminuarea fenomenelor de ecranare electrostatică a aminoacizilor acidici şi bazici din zona de constricţie, conducând astfel la o augumentare a energiei de interacţiune electrică între aceşti aminoacizi şi câmpul electric extern aplicat. Acest fenomen ar induce modificări spaţiale ale arhitecturii domeniului L3, ceea ce s-ar observa experimental prin apariţia stărilor cu conductivitate redusă a porinelor.

Într-adevăr, rezultate derivate din simulări de dinamică moleculară ale domeniului L3 au sugerat că mişcarea fizică a domeniului L3 în interiorul porinelor nespecifice ar putea fi un factor determinant al proceselor de voltaj-dependenţă a porinelor nespecifice. În acest context, însă, trebuie ţinut cont de faptul că acest domeniu L3 interacţionează prin multiple legături (punţi de sare, legături de hidrogen) cu interiorul porinei, şi deci deplasarea sa geometrică ar putea fi serios îngrădită, chiar şi în prezenţa unui câmp electric extern. Pe de altă parte, un experiment ce exclude cel puţin temporar mişcarea geometrică a domeniului L3 ca fiind determinantă în fenomenele de voltaj-dependenţă a porinelor nespecifice a fost realizat prin fixarea vârfului domeniului L3 de interiorul porinei OmpF, prin intermediul unor punţi disulfidice între doi aminoacizi cisteici introduşi prin mutageneză – unul aparţinând domeniului L3 şi altul, interiorului porinei – (E117C/A333C). În urma unor astfel de experimente, s-a constatat persistenţa substărilor conductive a porinelor studiate, precum şi o aparentă lipsă de alterare a sensibilităţii la diferenţele de potenţial externe ale cineticii respectivelor porine; astfel, mişcarea 'grosieră' a domeniului L3 nu poate fi un factor esenţial pentru fenomenul de voltaj-dependenţă a porinelor nespecifice.

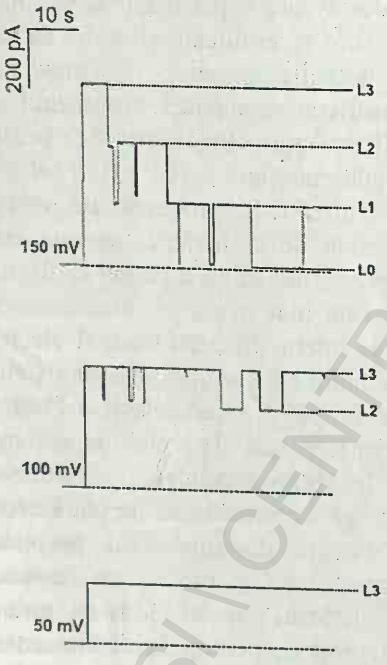


Figura 43 Înregistrări electrofiziologice ale proprietăţilor conductive specifice porinelor OmpF inserate în membrane lipidice artificiale. Se observă că valori relativ mari ale diferenţei de potenţial aplicate (150 mV – panel a) induc alterări conformaţionale ale acestor porine ce se reflectă în modificarea conductanţei lor; astfel, curentul electric delimitat de 'L3' este asociat transferului ionic mediat de toţi cei 3 monomeri ai porinei, iar stările 'L2' şi, respectiv, 'L1' sunt asociate situaţiilor în care unul sau doi dintre monomeri devin 'închişi' (vezi text).

2.3.2 Porine specifice

Pe lângă porinele nespecifice ce mediază procesele de transport prin membrana externă a bacteriilor Gram-negative, în care molecule ce satisfac anumite condiţii restrictive în ceea ce priveşte masa lor moleculară şi sarcina electrică

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

difuzează în virtutea gradientului lor de concentraţie, există şi porine ce interacţionează optim cu molecule difuzante specifice. Cele mai bune exemple în acest sens le constituie maltoporina LamB din membrana externă a bacteriei *E. coli* – ce favorizează, mai ales, difuzia maltooligozaharidelor – şi porina CsrY din membrana externă a bacteriei *S. typhimurium* care interacţionează cu specificitate sporită cu moleculele de sucroză. Cu toate că nu există asemănări de structură primară între porinele nespecifice şi cele specifice, structura terţiară a porinelor specifice este surprinzător de asemănătoare cu a celor nespecifice. Spre deosebire totuşi de OmpF, structura monomerică terţiară a maltoporinei este constituită din 18 domenii de tip '*β sheet*' antiparalele, iar regiunea internă constrictivă este formată din trei domenii ce asigură doar un diametru efectiv de 5 Å al acestor monomeri. Este interesant de remarcat existenţa a şase aminoacizi aromatici ce sunt desfăşuraţi în interiorul monomerilor de LamB, şi care se extind pe toată lungimea acestora (Fig. 44). Această regiune este denumită '*greasy slide*', iar experimente de cristalografie cu raze X realizate pe cristale de LamB în prezenţa unor soluţii saturate de maltodextrină au demonstrat existenţa unor regiuni de proximitate geometrică între grupările glucosil ale maltodextrinei şi aminoacizii aromatici de pe '*greasy slide*'. Aceste rezultate sugerează existenţa unor interacţiuni reversibile van der Waals între grupările chimice menţionate; suplimentar, din aceste date a fost dedusă existenţa unor interacţiuni tip legătură de hidrogen între grupările hidroxil ale moleculelor de zahăr şi aminoacizi polari specifici din interiorul porinei. Prin prisma acestor rezultate, a fost sugerat că mişcarea moleculelor de zahăr prin porină este asociată cu o continuă formare şi desfacere a acestor legături de hidrogen. Tot rezultatele derivate din cristalografia cu raze X au demonstrat că în cursul difuziei prin porină, moleculele de zahăr obstrucţionează parţial regiunea internă a acestora în zona de constricţie.

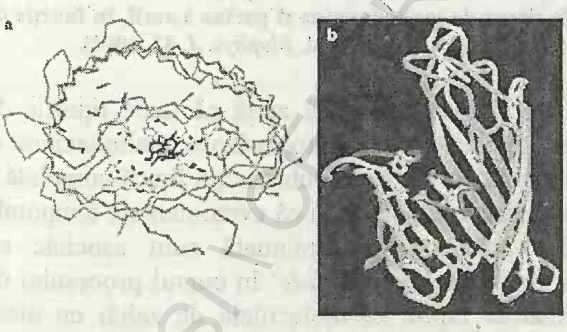


Figura 44 (a) Modelare moleculară ce evidenţiază o secţiune transversală printr-un monomer de maltoporină ce se află în interacţiune cu o moleculă de maltotrioză, dispusă relativ central. Aminoacizii ce formează domeniul '*greasy slide*', sunt evidenţiaţi în partea inferioară a acestei figuri. (b) Vedere laterală schematică a unui monomer de maltoporină, cu evidenţierea domeniului de aminoacizi aromatici ce formează regiunea '*greasy slide*' precum şi a două din domeniile '*loop*' ce compun regiunea internă constrictivă a acestuia (c) (adaptat din *www*).

Aceste concluzii au fost testate foarte elegant prin experimente de electrofiziologie realizate pe membrane lipidice artificiale, în care s-au realizat condiţii pentru inserţia porinelor studiate şi s-a demonstrat astfel că difuzia unor compuşi de

maltodextrină prin porinele LamB produce fluctuații de curent electric prin acestea (Fig. 45, panelul a).

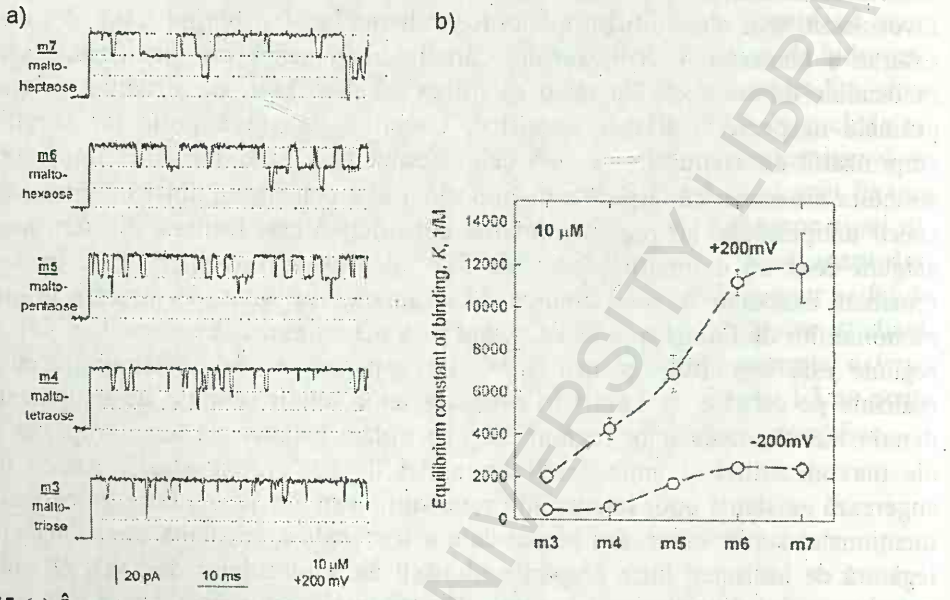


Figura 45 (a) Înregistrări electofiziologice la nivel de singură moleculă, ce arată modificările de curent electric ionic mediat de maltoporina LamB induse de interacțiunea cu diferite maltodextrine: maltoheptoaza (m7), maltotrioza (m3). Diminuarea cu o treime a curentului ionic maxim indică interacțiunea dintre o moleculă de zahăr din cele indicate cu o subunitate a trimerului de maltoporină. Diferența de potențial aplicată a fost de + 200 mV – în regiunea în care proteina a fost adăugată pentru inserția în membrana artificială – iar concentrația moleculelor de zahăr a fost de 10 μM, pentru toate tipurile de maltodextrine studiate. (b) Dependența constantei de echilibru (K) a interacțiunii dintre diferitele tipuri de maltodextrine și porina LamB, în funcție de diferența de potențial aplicată din exterior (adaptat L. Kullman et al, *Biophys. J.* 82, 2002).

Rezultatele obținute la nivel de singură moleculă arată că toate tipurile de molecule de zahăr studiate (maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose și maltoheptaose) induc în cursul difuziei prin porina LamB obstrucția fizică completă a interiorului monomerilor din structura porinei respective și că evenimentele temporale în care conductivitatea monomerilor porinei este diminuată sunt asociate cu interacțiunea moleculelor de zahăr cu regiunea '*greasy slide*' în cursul procesului de difuzie al acestora. Este ușor de remarcat faptul că moleculele de zahăr cu masa moleculară mai mică sunt prezenți în interiorul monomerilor porinei mai puțin timp decât cei cu masa moleculară mai mare. Acest fenomen este ușor de explicat dacă ținem seama că energia de interacțiune dintre molecula de zahăr și interiorul porinei este cu atât mai mare în valoare absolută, cu cât numărul interacțiunilor van der Waals și al legăturilor de hidrogen ce se stabilesc este mai mare, parametru ce este dependent-crescător de masa moleculară a moleculelor de zahar studiate. Aproximând procesele de interacțiune dintre moleculele de zahăr studiate și monomerii porinei ca fiind reversibile de tip '*on*' – '*off*', în care starea '*on*' este asociată monomerului de

porină blocat de o moleculă de zahăr şi starea '*off*' este asociată cu monomerul porinei fără molecula de zahăr în interiorul său, se poate defini constanta de echilibru (K) (M^{-1}) a acestei interacţiuni:

$$K = \frac{k_{on}}{k_{off}} \tag{35}$$

unde k_{on} şi k_{off} sunt constantele reacţiilor de asociere şi, respectiv, disociere dintre o moleculă de zahăr studiată şi interiorul unui monomer al porinei LamB.

Din figura de mai sus (Fig. 45, panel b), se evidenţiază faptul că indiferent de semnul diferenţei de potenţial aplicate (+200 sau -200 mV), valoarea constantei de echilibru creşte non-monotonic cu masa moleculară a moleculelor de maltozaharide studiate, iar acest rezultat este în deplină concordanţă cu sublinierea făcută mai sus privitoare la relaţia cantitativă de legătură existentă între energia de interacţiune porină-moleculă de zahăr şi masa moleculară a moleculei de zahăr.

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3 DESCRIEREA MICROSCOPICĂ A FENOMENELOR DE TRANSPORT CU APLICAȚII ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ

Încă din anul 1827, experimentul realizat de botanistul britanic R. Brown, de vizualizare a mișcării dezordonate, nepredictibilă, a unor particule de polen cu diametre de ordinul mm ce pluteau pe suprafața de separație apă-aer constituită pe o lamelă de microscop, a 'pus pe jar' comunitatea științifică din acea vreme; motivul principal a fost de a se încerca explicarea acelui fenomen prin prisma teoriei cinetice a gazelor. În anul 1889, G. L. Gouy a făcut o observație extrem de importantă, și anume că mișcarea Browniană era mai rapidă pe măsură ce dimensiunile particulelor observate erau mai mici. Prima explicație plauzibilă a acestui fenomen a fost propusă în 1877 de către Desaulx, care a afirmat că: '*In my way of thinking the phenomenon is a result of thermal molecular motion în the liquid environment (of the particles)*'. În anul 1900, F. M. Exner a fost cel care a realizat primul studiu cantitativ sistematic al mișcării browniene, și a evidențiat modul în care mișcarea observată depindea de temperatură și de mărimea geometrică a particulelor studiate. Cu toate aceste rezultate și observații remarcabile pentru acea vreme, abia în anul 1905, A. Einstein a dezvoltat prima teorie matematică a mișcării browniene, în care a fundamentat cantitativ legătura dintre parametrii mișcării și mărimi macroscopice, cum ar fi mobilitatea particulelor și coeficienți de vâscozitate ai mediilor în care acest fenomen era studiat. Și pentru astfel de contribuții științifice, A. Einstein a primit mai târziu în cariera sa premiul Nobel pentru fizică. În cele ce urmează, vom prezenta un formalism asemănător celui utilizat de Einsten, și care a fost elaborat în anul 1908 de prietenul său P. Langeniv.

Dacă presupunem că urmărim vizual o astfel de particulă browniană într-un interval de timp dat, și într-o proiecție simplificată în care mișcarea particulei este unidimensională, la intervale de timp succesive t_1, t_2, ... t_i ... am măsura valorile x_{t1}, x_{t2}, ... x_{ti} pentru valorile coordonatei spațiale a particulei. Așa cum este ușor de bănuit, valorile măsurate ale modificărilor de coordonată spațială succesive sunt diferite între ele și imposibil de prezis. Astfel, principiile fizicii newtoniene care se referă la și caracterizează procese deterministe, nu par de mult ajutor în analiza matematică a acestui fenomen fizic stochastic. De aceea, analiza detaliată a mișcării browniene nu poate fi realizată decât utilizând instrumentele matematice ale teoriei probabilistice. În general, analiza cantitativă a proceselor stochastice poate urma calea prezentată mai jos (Fig. 46): se fac 'n' măsurători ale valorilor x_{t1}, x_{t2}, ... x_{ti} la intervalele de timp t_1,

t_2, ... t_i. Altfel spus, se repetă acel experiment de 'n' ori, din care rezultă seria statistică x_{t1}, x_{t2}, ... x_{ti}. Aceste 'n' serii statistice poartă denumirea de ansamble statistice ('*ensembles*'). Se stabileşte un timp particular (t_i) de măsură al variabilei stochastice 'x' şi se fac 'n' evaluări diferite ale ei la acel moment din timp (x^j_{ti}); în continuare, toate referirile cantitative pe care le putem face referitor la acest proces stochastic sunt doar prin prisma noţiunii de probabilitate asupra mărimilor (x^j_{ti}) măsurate de 'n' ori la momentul temporal (t_i).

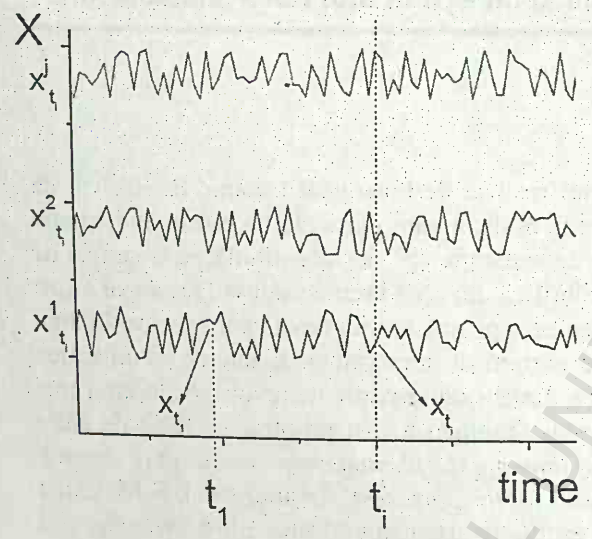


Figura 46 Reprezentarea schematizată a variaţiei temporale a mărimii stochastice 'x', aşa cum ar rezulta în urma a 'j' experimente distincte.

Într-o încercare de clasificare comprehensivă, prezentăm mai jos o reprezentare a tipurilor de procese întâlnite în natură :

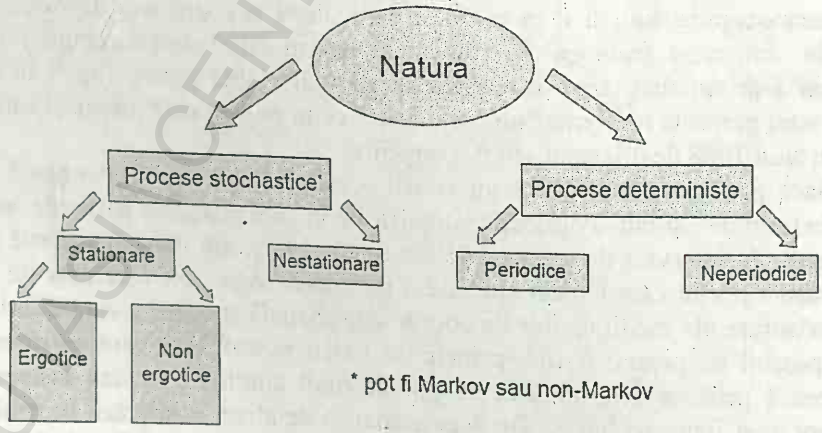


Figura 47 Clasificarea generală a categoriilor de procese distincte întâlnite în natură.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O mărime extrem de 'puternică' în implicaţii pentru caracterizarea cantitativă a unui proces stochastic este funcţia de densitate de probabilitate ('*probability density function*' – pdf). Funcţia de densitate de probabilitate (p(x)) pentru o variabilă stochastică, continuă ('x'), poate fi utilizată pentru a descrie probabilitatea de distribuţie a mărimii 'x'.

Prin definiţie, p(x) este o funcţie cu următoarele proprietăţi:

$$p(x) \geq 0$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} p(x)dx = 1 \tag{36}$$

$$P(a \leq x \leq b) = \int_{a}^{b} p(x)dx$$

Ultima relaţie exprimă faptul că probabilitatea ca variabila 'x' să aibă valoarea cuprinsă între valorile specifice 'a' şi 'b' este dată de integrala pe domeniul respectiv a lui p(x).

În formulare diferenţială, probabilitatea ca variabila stochastică 'x' să fie cuprinsă între 'a' şi 'a+dx' (dx <<) este dată de :

$$dP(a \leq x \leq a + dx) = p(a)dx \tag{37}$$

Cu ajutorul lui p(x) putem defini astfel valorile medii (μ) şi, respectiv, varianţa (σ^2) variabilei stochastice 'x':

$$\mu = \int_{-\infty}^{\infty} xp(x)dx$$

$$\sigma^2 = \int_{-\infty}^{\infty} (x-\mu)^2 p(x)dx = \int_{-\infty}^{\infty} (x)^2 p(x)dx - \mu^2 \tag{38}$$

Este important să facem distincţie între două tipuri de definire a noţiunii de 'probabilitate' cu relevanţă pentru mişcarea browniană, ce o vom aborda mai jos; astfel, dacă definim prin $P(x_0, t_0)$ şi $P(x_1, t_1)$ probabilităţile ca o particulă browniană să se afle în punctele de coordonate (x_0, x_1) la momentele (t_1, t_2), facem următoarele definiţii :

$P(x_1, t_1 / x_0, t_0)$ - probabilitatea ca la momentul (t_1) particula să se afle în punctul (x_1) ştiind că, în mod necesar, la momentul (t_0) ea se afla în punctul (x_0) ('*conditional probability*');

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$P(x_0,t_0;x_1,t_1)$ - probabilitatea ca la momentul (t_1) particula să se afle în punctul (x_1) şi la momentul (t_0) ea să se afle în punctul (x_0) ('*joint probability*').

Legătura dintre cele două tipuri de definire a probabilităţii pentru succesiunea de evenimente considerate este dată de teorema lui Bayes:

$$P(x_0,t_0;x_1,t_1)=P(x_1,t_1/x_0,t_0)P(x_0,t_0) \tag{39}$$

unde $P(x_0,t_0)$ este probabilitatea ca la momentul (t_0) particula să se afle în punctul (x_0).

Cu ajutorul definiţiilor de mai sus, putem aprecia că dacă la momentul (t_0) particula se afla în punctul (x_0), probabilitatea (dP) ca la momentul (t_1) particula să se afle în punctul (x_1 +dx) este dată de:

$$dP = P(x_1,t_1/x_0,t_0)dx \tag{40}$$

iar pentru orice valoare particulară a momentelor de timp (t_0, t_1), următoarea relaţie este îndeplinită :

$$\int dP = \int_{-\infty}^{\infty} P(x_1,t_1/x_0,t_0)dx = 1 \tag{41}$$

Aşa după cum vom mai repeta, facem precizarea că variabila 'x' pe care o studiem nu trebuie să fie necesar asociată exclusiv cu valoarea coordonatei spaţiale a particulei browniene studiate; ea se poate referi la viteza particulei, impulsul particulei sau mărimea saltului efectuat de particula studiată într-un interval de timp prestabilit.

Trebuie să facem aici o remarcă importantă: toate definiţiile utilizabile în teoria proceselor stochastice ce fac referiri la un ansamblu statistic, cu scopul de a deduce un parametru cantitativ şi care să caracterizeze specific acel fenomen stochastic (valori medii, erori standard, funcţie de auto-corelaţie etc.), utilizează şiruri de valori măsurate la un timp oarecare t_i (vezi mai sus). Astfel, pentru a caracteriza în termeni de valoare medie ansamblul statistic dat, se prestabileşte un timp oarecare (t_i) şi se fac (n) evaluări diferite ale mărimii (x) la acel moment din timp (x_{ti}), iar valoarea medie estimată a mărimilor măsurate este dată de următoarea expresie:

$$\left\langle X(t_i)\right\rangle = \lim_{n\to\infty}\frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n} x_{t_i}^{j} \tag{42}$$

Prin analogie, putem deduce expresii corespunzătoare pentru ceilalţi parametri ce caracterizează cantitativ un ansamblu statistic. De exemplu, valoarea funcţie de autocorelaţie ce caracterizează procesul stochastic studiat se scrie:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$R_x\left(t_i, t_i+\tau\right) = \lim_{n\to\infty} \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n} x^j_{t_i}\, x^j_{t_i+\tau} \qquad (43)$$

unde sumarea se face pentru toate valorile 'j' ce provin din cele 'n' ansamble măsurate, iar $x^j_{t_i}$ şi $x^j_{t_i+\tau}$ reprezintă valorile măsurate ale variabilei 'x' într-o realizare posibilă din cele 'n' studiate, la o diferenţă de interval temporal 'τ'.

Din punct de vedere practic, în mod sigur, vom avea o problemă în utilizarea formulelor 42-43 pentru evaluări cantitative, pe baza unor mărimi măsurate experimental 'x' ; evident, aceasta decurge din faptul că în cursul unei vieţi finite nu putem realiza un număr infinit de măsurători, aşa cum este 'solicitat' de implementarea teoretică a acestor formule. Doar ca să fiu punctual, în ceea ce priveşte de exemplu formula 42, evaluarea valorii medii pe baza unui număr finit 'n' de măsurători 'x' ce se referă la o variabilă stochastică oarecare, va genera un număr ('valoare medie') ce va fi, de asemenea, distribuit stochastic – altfel spus, între oricare alte serii de 'n' măsurători independente ale variabilei 'x', valorile medii calculate pe baza formulei 42 vor diferi între ele. Pentru o discuţie detaliată despre aceste aspecte extrem de interesante de analiză a datelor, şi care implică definirea unor noi parametri statistici (e.g., eroare standard – ce se referă la gradul de variabilitate al valorilor medii derivate dintr-un număr finit de măsurători ale variabilei 'x'), cititorul este rugat să consulte un material detaliat de analiză statistică a datelor experimentale.

Dacă mărimile $\langle X(t_i)\rangle$ sau $R_x(t_i, t_i+\tau)$ definite mai sus nu depind de 't_i', spunem că procesul studiat este staţionar. Există o clasă extrem de importantă de procese stochastice staţionare pentru care, de exemplu, valoarea estimată a mediei scrisă aşa ca mai sus este identică cu media calculată din (n) valori măsurate la intervale de timp succesive $t_1, t_2, .. t_i ... t_n$ pentru doar o singură realizare a acelui proces.

$$\langle X(t_i)\rangle = \lim_{n\to\infty} \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n} x^j_{t_i} = \lim_{n\to\infty} \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_{t_i} = \overline{X(t)} \qquad (44)$$

În cazul continuu, expresia de mai sus se scrie astfel:

$$\langle X(t)\rangle = \overline{X(t)} = \lim_{T\to\infty} \frac{1}{T}\int_0^T X(t)dt \qquad (45)$$

Analog, expresia varianţei valorilor din ansamblul stochastic considerat este dată de:

BCU IAŞI CENTRALA CARTE

$$\sigma^2 = \lim_{T \to \infty} \frac{1}{T} \int_0^T \left(X(t) - \langle X(t) \rangle\right)^2 dt \qquad (46)$$

Aceste procese, pentru care media pe ansamble este identică cu media temporală efectuată pe o singură realizare a acelui proces, se numesc procese stochastice staționare ergotice; chiar dacă ipoteza ergotică este destul de greu de demonstrat pentru orice proces stochastic, se obișnuiește acceptarea presupunerii de ergodicitate pentru un proces stochastic staționar studiat. După cum este ușor de înțeles, acceptarea ipotezei de ergodicitate simplifică mult analiza datelor stochastice; este mult mai simplu de măsurat valoarea medie a unor variabile stochastice dintr-o singură măsurătoare, prin medierea valorilor măsurate la intervale succesive t_1, t_2, ... t_i... t_n de timp, decât efectuarea de 'n' experimente distincte și apoi evaluarea valorii medii pe ansamble. Dacă nu vom face precizări contrare, în cele ce urmează, vom presupune că procesele stochastice studiate sunt staționare și ergotice.

3.1 Descrierea mișcării browniene cu ajutorul formalismului lui Langevin

Revenind la mișcarea browniană, unul din primele postulate care încercau să explice caracterul stochastic al acesteia făcea referire la procesul de ciocnire continuă pentru fiecare din particulele observate, cu moleculele din mediul înconjurător. Una din teoriile de bază ce tratează mișcarea unei particule browniene este cea elaborată de fizicianul francez Paul Langevin, care, în legea fundamentală de mișcare a oricărei particule din natură sub acțiunea unei forțe, a adăugat un termen suplimentar numit forță fluctuantă; aceasta reflectă tocmai rezultatul acțiunii simultane la un moment de timp dat al mediului înconjurător asupra particulei sub observație.

Astfel, legea de mișcare în cazul unidimensional pentru o particulă browniană liberă, cu masa 'm', este dată de expresia:

$$m\frac{dv}{dt} = -m\gamma v + f(t) \qquad (47)$$

unde :

$m\gamma$ – este coeficientul de frecare al particulei cu mediul înconjurător;

v – este viteza particulei;

f(t) – este forța stochastică ce se exercită simultan din partea constituenților din imediata vecinătate a particulei prin ciocniri considerate elastice;

$m\gamma v$ – este forța de frecare dintre particula considerată și mediul înconjurător, cauzată de ciocniri elastice cu alte particule din imediata vecinătate.

BCU IASI | CENTRUL UNIVERSITAR

Evident, deoarece forţa f(t) este de natură stochastică, prin intermediul ecuaţiei de mai sus – denumită ecuaţia lui Langevin – valorile vitezei şi, respectiv, ale coordonatei particulei devin mărimi stochastice. Analiza cantitativă a ecuaţiei lui Langevin presupune caracterizarea, în termeni probabilistici, a vitezei şi a coordonatei particulei studiate. Una din primele presupuneri făcute în ceea ce priveşte forţa stochastică f(t) se referă la valoarea sa medie :

$$\langle f(t) \rangle = 0 \tag{48}$$

Deoarece mediul este considerat omogen şi izotrop, presupunerea de mai sus este în foarte bună concordanţă cu bunul-simţ ştiinţific.

Astfel, prin medierea pe ansamble a ecuaţiei lui Langevin, obţinem:

$$m\frac{d\langle v \rangle}{dt} = -m\gamma\langle v \rangle \tag{49}$$

(trebuie subliniat că, deocamdată, nu facem nici o presupunere cu privire la caracterul de staţionaritate sau ergoticitate al procesului studiat şi deci utilizăm relaţia de definire a valorii medii pe ansamble).

Soluţia ecuaţiei diferenţiale de mai sus ne spune că în termeni medii, viteza iniţială a particulei va descreşte exponenţial spre zero; astfel, energia cinetică medie iniţială a particulei browniene va fi convertită în mişcare dezordonată a particulelor mediului înconjurător. Acest proces se numeşte 'disipare' şi are loc, prin urmare, datorită interacţiunilor continue între constituenţii mediului. Menţionăm că, aşa după cum vom vedea mai târziu, există o legătură indisolubilă între coeficientul de frecare şi forţa fluctuantă.

Dacă înmulţim ecuaţia lui Langevin (47) cu variabila 'x', obţinem:

$$\begin{aligned} m\frac{dx'}{dt}x &= -m\gamma x'x + f(t)x \\ v &= \frac{dx}{dt} = x' \end{aligned} \tag{50}$$

Primul termen din ecuaţia de mai sus se poate scrie echivalent:

$$m\frac{dx'}{dt}x = m\left[\frac{d}{dt}(xx') - (x')^2\right] \tag{51}$$

Mediată pe ansamble, ecuaţia lui Langevin devine:

BCU IAŞI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$m\left\langle \frac{d}{dt}(xx') \right\rangle = -m\gamma\langle xx'\rangle + m\left\langle (x')^2 \right\rangle \tag{52}$$

Pentru expresia de mai sus am omis termenul <f(t)x>, fapt ce poate fi uşor de demonstrat de către cititor. Suplimentar, dacă facem apel la termodinamica clasică (i.e., echipartiţia energiei cinetice medii pe grade de libertate), ştim că pentru un singur grad de libertate:

$$m\left\langle (x')^2 \right\rangle = kT \tag{53}$$

Astfel, ecuaţia (52) devine:

$$m\frac{d}{dt}(\langle xx'\rangle) = -m\gamma\langle xx'\rangle + kT \tag{54}$$

Soluţia ecuaţiei de mai sus, în care necunoscuta este $\langle xx'\rangle$, se poate scrie:

$$\langle xx'\rangle = Ae^{-\gamma t} + \frac{kT}{m\gamma} \tag{55}$$

Dacă presupunem că la momentul iniţial x = 0, rezultă că valoarea constantei de integrare este dată de:

$$A = -\frac{kT}{m\gamma} \tag{56}$$

În continuare, dacă rescriem:

$$\langle xx'\rangle = \frac{1}{2}\frac{d}{dt}\langle x^2\rangle \tag{57}$$

Relaţia (55) devine:

$$\frac{1}{2}\frac{d}{dt}\langle x^2\rangle = \frac{kT}{m\gamma}\left(1 - e^{-\gamma t}\right) \tag{58}$$

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Această ecuaţie diferenţială în care necunoscuta este $\langle x^2 \rangle$ are soluţia dată de:

$$\langle x^2 \rangle = \frac{2kT}{m\gamma}\left[t - \frac{1}{\gamma}\left(1 - e^{-\gamma t}\right)\right] \tag{59}$$

În legătură cu această ecuaţie, sunt interesante următoarele particularizări asupra cărora vom reveni şi mai târziu: pentru timpi scurţi de observaţie ($t << 1/\gamma$), şi în urma descompunerii în termeni Taylor a exponenţialei de mai sus, rezultă :

$$\langle x^2 \rangle = \frac{kT}{m} t^2 \tag{60}$$

Astfel, în acest context, putem aprecia că particula browniană se mişcă liber cu viteza medie pătratică constantă prezisă de termodinamica clasică, iar mişcarea aceasta trebuie să fie vizualizată, ca şi cum ar avea loc între două ciocniri succesive. Trebuie menţionat că mişcarea particulei browniene vizualizată între două ciocniri succesive – fapt ce aproximează studierea sa pentru timpi scurţi de observaţie, aşa cum a fost menţionat mai sus – rămâne un fenomen stochastic. În acest sens, dacă ar fi să comparăm distanţele parcurse de particulă între oricare două ciocniri succesive, precum şi vitezele particulei în aceleaşi condiţii, aceste valori estimate sunt mărimi variabile şi aleatorii. Cu toate acestea, valoarea medie a pătratelor distanţelor parcurse de particulă între oricare două ciocniri succesive este prezisă de formula (60), ceea ce corespunde unei viteze medii pătratice invariabile în timp şi identică în valoare cu cea dedusă din considerente de temodinamică clasică.

Pentru timpi mari de observaţie ($t >> 1/\gamma$):

$$\langle x^2 \rangle = \frac{2kT}{m\gamma} t \tag{61}$$

În acest caz, modificările stochastice de viteză ale particulei sunt în deplină concordanţă cu un alt formalism consacrat de analiză a fenomenelor Browniene, concretizat de ecuaţia Fokker-Planck. Deoarece vom mai reveni asupra interpretării formulei (61), menţionăm aici doar că pentru asemenea timpi de observaţie mari, varianţa 'paşilor' unidimensionali străbătuţi de particula studiată într-un interval de timp 't' – 'paşi' ce sunt cuantificaţi de mărimea stochastică 'x' – creşte proporţional cu valoarea intervalului de observaţie a lor ('t'). Din relaţia de definiţie a coeficientului de difuzie dată de formalismul Fokker-Planck pe care îl vom prezenta mai târziu, ştim că:

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$D = \frac{\langle x^2 \rangle}{2t} \tag{62}$$

Astfel, din relațiile (61) și (62) rezultă o relație foarte importantă ce face legătura fizică între coeficientul de frecare al particulei browniene și coeficientul de difuzie, măsurabil macroscopic:

$$D = \frac{kT}{m\gamma} \tag{63}$$

În continuare, pentru a deduce informații suplimentare despre mecanismul forței fluctuante ce generează mișcarea browniană studiată, considerăm că particula studiată a atins echilibrul termic cu mediul înconjurător, viteza sa medie este nulă, iar viteza sa medie patratică este dată de expresia prezisă alternativ de termodinamica clasică (53).

Astfel, considerăm că prin prisma parametrului 'v', particula browniană execută o mișcare stochastică, staționară și ergotică. Aplicând operatorul de transformare integrală Fourier (vezi în cele ce urmează, relațiile 68) ecuației lui Langevin (47) rezultă:

$$mj\omega v(\omega) = -m\gamma v(\omega) + f(\omega) \tag{64}$$

sau, scris altfel:

$$v(\omega) = \frac{f(\omega)}{m(j\omega + \gamma)} \tag{65}$$

Doar pentru a reaminti cititorului, prin prisma variabilei 'v', mișcarea browniană studiată se consideră a fi un proces stochastic și staționar; dacă îl considerăm și ergotic, medierea pe ansamble este identică cu medierea temporală a funcției stochastice v(t). Astfel, utilizând relația (65), legătura între funcțiile de densitate de putere spectrală ($S(\omega)$) ale mărimilor $v(\omega)$ și $f(\omega)$ este dată de:

$$S_v(\omega) = \frac{1}{m^2(\omega^2 + \gamma^2)} S_f(\omega) \tag{66}$$

Dacă facem presupunerea că f(t) este în cea mai simplă exprimare fizică de tip '*white-noise*' (sau 'zgomot alb'), și ce este echivalent cu a spune că densitatea sa de putere spectrală este distribuită uniform pe scara frecvențelor ($S_f(\omega)=S_f$=ct.), putem scrie pentru funcția sa de autocorelație:

BU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$R(\tau)=\lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\int_{-\frac{T}{2}}^{\frac{T}{2}}f(t)f(t+\tau)dt=\langle f(t)f(t+\tau)\rangle=S_f\delta(\tau) \qquad (67)$$

Presupunerea de mai sus se bazează pe faptul că ciocnirile particulei browniene cu ceilalţi constituenţi din mediul înconjurător sunt extrem de rapide şi total necorelate, rezultând astfel un caracter de tip funcţie 'delta' (δ(t), în expresia 67) pentru funcţia de auto-corelaţie a forţei f(t). Pentru deducerea relaţiei (67), am utilizat relaţiile de transformare Fourier integrale:

$$f(t)=\frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{\infty}F(\omega)e^{j\omega t}d\omega$$
$$F(\omega)=\int_{-\infty}^{\infty}f(t)e^{-j\omega t}dt \qquad (68)$$

în congruenţă cu una din relaţiile de definiţie a funcţiei 'delta' ($\delta(\tau)=\frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{\infty}e^{j\omega\tau}d\omega$) şi cu un rezultat interesant al teoremei Wiener-Khintchine exprimat de egalităţile :

$$R(\tau)=\frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{\infty}S(\omega)e^{j\omega\tau}d\omega$$
$$S(\omega)=\int_{-\infty}^{\infty}R(\tau)e^{-j\omega\tau}d\tau \qquad (69)$$

Relaţiile (69) ne spun că densitatea de putere spectrală a unei funcţii staţionare (deterministe sau stochastice) ($S(\omega)$) şi funcţia sa de auto-corelaţie ($R(\tau)$) formează o pereche Fourier, ele obţinându-se una din cealaltă prin intermediul setului de transformări Fourier (68). Astfel, deducem că, în cazul nostru particular, un semnal temporal al cărui densitate de putere spectrală este dată de o funcţie constantă cu frecvenţa (notată în cazul nostru simplu, cu $S_f(\omega)=S_f$=ct.), posedă o funcţie de auto-corelaţie de tip 'delta' dată de formula (67).

Dacă forţa stochastică este descrisă de relaţia de mai sus (67), din aplicarea teoriei Wiener-Khintchine relaţiei (66), rezultă că funcţia de autocorelaţie pentru v(t) este dată de :

BCU "CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY"

$$\langle v(t)v(t+\tau)\rangle = \frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{\infty} S_v(\omega)e^{j\omega\tau}d\omega \tag{70}$$

Ţinând cont de rezultatul (66) ce defineşte relaţia existentă între funcţiile de densitate de putere spectrală ale mărimilor $v(\omega)$ şi $f(\omega)$, şi prin efectuarea integralei de mai sus, rezultă că funcţia de auto-corelaţie pentru v(t) se poate scrie astfel:

$$\langle v(t)v(t+\tau)\rangle = \frac{S_f}{2m^2\gamma}e^{-\gamma\tau} \tag{71}$$

Rezultatul de mai sus ne dă o mărime cantitativă a intervalelor de timp de corelare a vitezelor particulei; pentru timpi de observaţie mici ($\tau << 1/\gamma$), valorile succesive ale vitezei particulei sunt corelate, fapt ce are sens, deoarece am arătat mai sus că în acest interval de timp viteza medie pătratică a particulei este constantă. Pentru timpi de observaţie mari ($\tau >> 1/\gamma$) funcţia de auto-corelaţie pentru viteza particulei (v(t)) devine nulă, iar realizările succesive ale vitezei particulei sunt total necorelate. Este important de remarcat că, chiar dacă funcţia stochastică f(t) are funcţia de autocorelaţie de tip 'delta' (vezi mai sus), funcţia de autocorelaţie pentru v(t) descreşte exponenţial, având constanta de timp dată de 'γ'.

Putem deduce, în continuare, informaţii suplimentare despre intensitatea funcţiei stochastice f(t); astfel, dacă facem $\tau = 0$, din expresia funcţiei de autocorelaţie pentru viteza particulei (71) deducem că:

$$\langle v^2\rangle = \frac{S_f}{2m^2\gamma} \tag{72}$$

Dar, din termodinamica clasică ştim că pentru un singur grad de libertate, în condiţii de echilibru termic, $m\langle v^2\rangle = kT$; prin combinarea acestui rezultat cu expresia (72), rezultă că:

$$S_f = 2m\gamma kT \tag{73}$$

Astfel, expresia funcţiei de autocorelaţie pentru forţa fluctuantă f(t) ce determină proprietatea de stochasticitate a mişcării browniene (67) este dată de:

$$\langle f(t)f(t+\tau)\rangle = 2m\gamma kT\delta(\tau) \tag{74}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prin integrare în raport cu timpul, şi ţinând cont de una din proprietăţile funcţiei δ(t) ($\int_{-\infty}^{\infty}\delta(\tau)d\tau=1$), această expresie se mai poate scrie şi astfel :

$$\gamma=\frac{1}{2mkT}\int_{-\infty}^{\infty}\langle f(t)f(t+\tau)\rangle d\tau \qquad (75)$$

Aceasta exprimă un rezultat foarte important, ce poartă numele de '*fluctuation-dissipation theorem*'. Altfel spus, coeficientul de frecare este numeric egal cu integrala, în raport cu timpul a funcţiei de autocorelaţie a forţei fluctuante f(t). Tot din rezultatele de mai sus, deducem o altă concluzie interesantă: prin integrarea în raport cu variabila 'τ' a funcţiei de auto-corelaţie a vitezei particulei considerate, rezultă :

$$\int_0^{\infty}\langle v(t)v(t+\tau)\rangle d\tau=\int_0^{\infty}\frac{kT\gamma}{m\gamma}e^{-\gamma\tau}d\tau=D\int_0^{\infty}\gamma e^{-\gamma\tau}d\tau=D \qquad (76)$$

Deci, valoarea coeficientului de difuzie a particulei respective este dată de integrala temporală a funcţiei de auto-corelaţie a vitezei sale.

Chiar dacă până acum am dedus relaţii importante ce dau indicii cantitative despre procesul brownian studiat, întrebarea fundamentală rămâne: ce putem spune despre soluţia ecuaţiei lui Langevin? Dacă ştim valorile la momentul iniţial (t_0) pentru coordonata şi, respectiv, viteza particulei (x_0, v_0), care sunt probabilităţile de obţinere a unor valori particulare pentru cele două mărimi (x_t, v_t) la un timp ulterior (t)?

Soluţia formală a ecuaţiei diferenţiale-stochastice a lui Langevin este dată de expresia:

$$v(t)=v(t_0)e^{-\gamma\left(t-t_0\right)}+\int_{t_0}^{t}e^{-\gamma\left(t-t'\right)}\frac{f(t')}{m}dt' \qquad (77)$$

Spre deosebire de o ecuaţie diferenţială 'ordinară', a cărei soluţie ar descrie evoluţia deterministă a unui fenomen oarecare, o ecuaţie diferenţială-stochastică are soluţie descriptibilă în termeni statistici şi exprimată deci doar în termeni probabilistici. Aşadar, din analiza statistică a ecuaţiei (77), nefăcând nici o presupunere cu privire la caracterul de staţionaritate sau ergoticitate al procesului studiat, însă făcând presupunerea simplificatoare şi întemeiată că pe lângă caracterul de '*white noise*' discutat mai sus (vezi relaţiile 66-67), f(t) provine dintr-o distribuţie statistică de tip Gauss, rezultă că soluţia sa dată de probabilitatea tranziţiei (v_0, t_0) → (v_t, t) este tot de tip gaussian:

BCU CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

$$P(v_t, t/v_0, t_0) = \left(\frac{m}{2\pi kT}\right)^{\frac{1}{2}} \frac{1}{\left(1-e^{-2\gamma(t-t_0)}\right)^{\frac{1}{2}}} e^{\left(\frac{\frac{m}{2kT}\left(v_t - v_0 e^{-\gamma(t-t_0)}\right)^2}{1-e^{-2\gamma(t-t_0)}}\right)} \quad (78)$$

Probabilitatea tranziției $(v_0, t_0) \rightarrow (v_t, t)$ are semnificație de '*probability density function*' (vezi definițiile de la începutul acestui capitol); astfel, având în vedere starea inițială a particulei (v_0, t_0), probabilitatea (dP) ca la momentul (t) viteza particulei să fie cuprinsă între $\{v_t, v_t + dv\}$ este dată de:

$$dP = P(v_t, t/v_0, t_0)dv \quad (79)$$

Astfel, se poate verifica simplu că la orice moment temporal particular 't', probabilitatea ca viteza particulei să fie cuprinsă pe întreg domeniul posibil de valori este maximă și egală cu unu:

$$\int_{-\infty}^{\infty} P(v_t, t/v_0, t_0)dv = 1 \quad (80)$$

Utilizând relațiile de mai sus și efectuând calculele aferente, putem regăsi valorile vitezei medii și, respectiv, ale varianței vitezei particulei la momentul (t) obținute din medierea pe ansamble a ecuației lui Langevin:

$$\langle v_t \rangle = v_0 e^{-\gamma\left(t-t_0\right)} \quad (81)$$

$$\left\langle \left(v_t - \langle v_t \rangle\right)^2 \right\rangle = \frac{kT}{m}\left(1 - e^{-2\gamma\left(t-t_0\right)}\right) \quad (82)$$

(după cum cititorul poate verifica, am regăsit astfel relații deduse anterior, urmând însă un alt raționament).

Suplimentar, în condițiile în care starea sistemului privită prin prisma parametrului 'viteză' este staționară – particula a atins echilibrul termic cu mediul înconjurător ($t >> 1/\gamma$), se poate deduce ușor că valoarea probabilității ca viteza particulei să fie cuprinsă între $\{v, v + dv\}$ devine independentă de timp, iar expresia obținută este identică cu cea cunoscută din termodinamica clasică, dată de distribuția

BCU "SI I CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de tip Maxwell. Suplimentar, în condiţii de echilibru termic, valoarea medie a vitezei particulei la orice moment (t) este nulă (când $t >> 1/\gamma \rightarrow \langle v_t \rangle \rightarrow 0$). Acum putem înţelege analitic un rezultat experimental arhicunoscut, şi anume că histograma valorilor curentului electric printr-un rezistor aflat la echilibru (sau aproape de echilibru) este o funcţie de tip Gauss, centrată în jurul valorii medii nule. Întrebarea pe care o poate ridica cititorul aici este: dacă valorile de mai sus (81 şi 82) indică un caracter de 'nestaţionaritate' pentru procesul stochastic studiat, dat de caracterul de dependenţă temporală a valorilor vitezei medii şi, respectiv, a varianţei vitezei particulei la momentul (t), cât de bună este presupunerea fundamentală pe care am făcut-o la implementarea analizei spectrale a ecuaţiei lui Langevin şi anume că acest proces este stochastic şi staţionar?

Se impun aici câteva precizări care să fundamenteze înţelegerea caracterului de staţionaritate al procesului statistic studiat prin prisma valorilor vitezei 'v' a particulei browniene, pe baza căruia am implementat formalismul descris mai sus cu privire la analiza spectrală a ecuaţiei lui Langevin, şi care a condus la o expresie elegantă pentru funcţia de autocorelaţie a vitezei particulei studiate. În cazul mişcării unidimensionale, dacă o particulă browniană este 'adusă' într-un mediu oarecare ce are temperatura absolută 'T', şi dacă viteza sa iniţială este 'v_0', datorită ciocnirilor cu particulele din mediul înconjurător, ea îşi va disipa o parte din energia iniţială până când viteza ei medie devine nulă şi deci particula execută doar o mişcare stochastică; energia cinetică medie a particulei în aceste condiţii va fi dată de formula cunoscută din termodinamica clasică (kT/2). Timpul până când se întâmplă acest lucru depinde de forţa de frecare dintre particulă şi mediu, nu depinde de temperatura mediului şi pentru dimensiuni moleculare, valoarea acestui timp este de $\sim 10^{-9}$ secunde. Deci, orice operaţiune experimentală de investigare a proprietăţilor cinetice ale particulei studiate va trebui să ţină seama că după acest interval de timp, din punct de vedere al vitezei, comportamentul particulei este considerat stochastic şi staţionar, cu valori constante pentru media şi, respectiv, varianţa valorilor vitezei sale. Deci analiza spectrală de mai sus a ecuaţiei lui Langevin pentru descrierea cantitativă a proprietăţilor stochastice ale particulei browniene, prin prisma parametrului 'v', aveau în vedere faptul că particula studiată era deja echilibrată termic – viteza sa medie este nulă. Fig. 48 este elocventă în a ajuta cititorul să vizualizeze proprietatea de staţionaritate a mărimilor 'v', mai sus definite. Din considerentele expuse mai sus, adusă cu viteza iniţială 'v_0' într-un mediu aflat la echilibru termic, particula studiată va înregistra modificări stochastice ale valorii vitezei, iar valoarea medie a vitezei sale va descreşte exponenţial spre zero. Pentru cele două realizări compuse din înregistrările făcute asupra mărimilor instantanee 'v', se poate observa că pe lângă faptul că sunt fluctuante în natură (vezi mai sus), pentru intervale de timp mici ($t << 1/\gamma$) mediile pe ansamble (<v1> şi <v2>) realizate la doi timpi diferiţi (t_1 şi $t_2 << 1/\gamma$) sunt diferite; astfel, din punct de vedere al mărimii studiate ('v'), pe acest interval de timp, procesul este nestaţionar. După ce particula a atins echilibrul termic cu mediul înconjurător ($t >> 1/\gamma$), valorile instantanee ale vitezelor vor fi în aşa fel distribuite, încât valorile medii pe cele două realizări vor fi identice, constante şi nule, iar procesul va deveni staţionar.

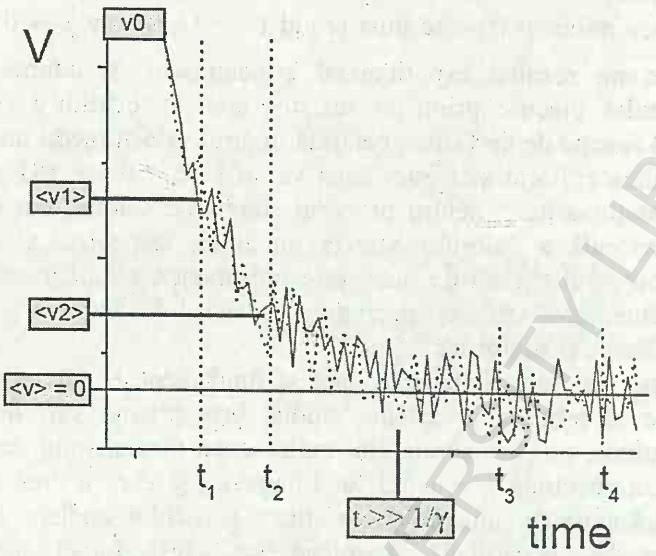


Figura 48 Reprezentarea simulată, în unități de măsură arbitrare, a vitezei instantanee a unei particule ce execută o mișcare browniană.

Cu toate acestea, și în acest caz, viteza instantanee a particulei browniene este diferită de 0 (ea ar fi nulă doar la o temperatură de zero grade Kelvin), iar gradul de asemănare dintre valori consecutive ale vitezei instantanee a particulei este dat de formula dedusă din analiza spectrală anterioară a ecuației lui Langevin (71).

În plus, în virtutea proprietății de staționaritate, expresia (71) depinde doar de 'τ' și este independentă de valoarea particulară a lui 't'. Astfel, deducem că deși procesul este stochastic și staționar în esență din punct de vedere al variabilei 'v', există un interval de timp extrem de mic ($\tau << 1/\gamma$) pentru care valori instantanee, succesive ale vitezei particulei sunt parțial asemănătoare.

Asemănător, putem demonstra din analiza statistică a ecuației lui Langevin că:

$$P(x,t/0,0)=\left[4\pi D\left(t-\frac{1-e^{-\gamma t}}{\gamma}\right)\right]^{-\frac{1}{2}} e^{\left\{-x^2\left[4D\left(t-\frac{1-e^{-\gamma t}}{\gamma}\right)\right]^{-1}\right\}} \quad (83)$$

unde coeficientul de difuzie 'D' este dat de relația lui Einstein (63) ($D=\frac{kT}{m\gamma}$)

Expresia de mai sus (83) oferă o măsură cantitativă a probabilității că la momentul (t) coordonata spațială a particulei să fie (x), știind că la momentul inițial (t = 0) valoarea coordonatei spațiale era nulă (x = 0). Ca și în cazul anterior când făceam

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

referiri la viteza particulei browniene, expresia (83), are semnificaţia de '*probability density function*' pentru variabila stochastică 'x'. Din expresia de mai sus (83) şi calculând valoarea medie a pătratelor variabilelor spaţiale 'x', aşa cum s-ar obţine la timpul particular 't', regăsim o exprimare a afirmaţiei făcute mai sus cu privire la diferitele scale temporale ale procesului stochastic studiat:

$$\left\langle x(t)^2 \right\rangle = 2D\left(t - \frac{1-e^{-\gamma t}}{\gamma} \right) \tag{84}$$

Astfel, pentru timpi scurţi de observaţie ($t << 1/\gamma$):

$$\left\langle x^2 \right\rangle \approx \frac{kT}{m} t^2 \tag{85}$$

(particula se mişcă stochastic, având viteza medie pătratică constantă).

Pentru timpi de observaţie mari, ($t >> 1/\gamma$), particula suferă o multitudine de ciocniri cu mediul înconjurător, coordonata sa devine total necorelată cu coordonata iniţială ('particula browniană') şi regăsim că poziţia sa la un moment (t) ulterior momentului iniţial (0) este dată în termeni probabilistici de:

$$P(x,t/0,0) = \left[4\pi Dt\right]^{-\frac{1}{2}} e^{\left\{-\frac{x^2}{4Dt}\right\}} \tag{86}$$

iar deviaţia standard a mărimilor 'x' este dată de:

$$\sqrt{\left\langle (\Delta x)^2 \right\rangle} = \sqrt{\left\langle x^2 \right\rangle} = \sqrt{2Dt} \tag{87}$$

Pentru deducerea expresiei deviaţiei standard a mărimilor 'x' la un moment temporal oarecare 't', s-au utilizat relaţiile de definire a valorilor medii (μ) şi, respectiv, varianţei (σ^2) variabilei stochastice 'x' (38) în care funcţia de densitate de probabilitate p(x,t) este dată de expresia (86), şi am ţinut seama de faptul că în contextul discutat (i.e., timpi de observaţie mari, caracterizaţi de condiţia $t >> 1/\gamma$), valoarea medie a variabilelor 'x' este nulă, deoarece $\langle v_t \rangle \to 0$; astfel, media pătratelor variabilelor spaţiale 'x' defineşte tocmai varianţa valorilor 'x'.

Acestea sunt rezultate foarte interesante care dau informaţii cantitative despre probabilitatea de localizare a particulei brownine la un moment (t), ulterior

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

momentului inițial ales (0), când poziția particulei era cunoscută; în plus, se vede din relația de mai sus că evoluția particulei la momentul (t) ales nu depinde de istoria precedentă momentului ales ca 'inițial'. Spunem deci că mișcarea Browniană este în acest caz de tip Markov – 'fără memorie' – iar un rezultat identic se va obține, în cele ce urmează, din teoria Fokker – Planck. Pentru timpi de observație mici – vezi mai sus – mișcarea browniană este stochastică, dar nu reflectă un proces de tip Markov din punct de vedere al mărimii observate 'x'. Această afirmație poate fi înțeleasă prin aceea că pentru intervale mici de observație, viteza particulei mai este corelată cu ea însăși, așa după cum am arătat mai sus. Suplimentar, trebuie să reținem că din punct de vedere al parametrului 'x', mișcarea browniană studiată nu poate fi privită ca un proces stochastic staționar, așa după cum vom demonstra mai jos și după cum se poate vedea ușor din expresiile de mai sus. Chiar și pentru timpi mari de observație ($t >> 1/\gamma$), când particula ajunge la echilibru termic cu mediul înconjurător, varianța mărimii 'x' este dependentă de timp – ceea ce contravine postulatelor ce definesc un proces stochastic staționar.

3.2 Ecuația Fokker – Planck

Un alt formalism extrem de util în tratarea cantitativă a proceselor stochastice, în general, și a celor de difuzie, în particular, este bazat pe aplicarea ecuației integrale Chapman-Kolmogorov ce caracterizează probabilistic evoluția sistemelor stochastice și de tip Markov. Dacă definim prin $P(x_1, t_1)$, $P(x_2, t_2)$, $P(x_3, t_3)$ probabilitățile ca o particulă browniană să se afle în punctele de coordonate (x_1, x_2, x_3) la momentele (t_1, t_2, t_3), proprietatea de 'proces Markov' a respectivului proces stochastic studiat – modificarea coordonatei particulei la momente de timp succesive – se poate transcrie matematic astfel:

$$P(x_1,t_1;x_2,t_2;x_3,t_3) = P(x_1,t_1)P(x_2,t_2/x_1,t_1)P(x_3,t_3/x_2,t_2) \qquad (88)$$

Altfel spus, pentru orice interval distinct (t_2) ales arbitrar între t_1 și t_3, evoluția sistemului în intervalul temporal ($t_1 - t_3$) poate fi reconstruită, cunoscând evoluția sistemului pe intervalele distincte (t_1, t_2) și (t_2, t_3). Știind că pentru a ajunge în starea finală (x_3), particula browniană studiată poate să treacă la momentul (t_2) printr-o multitudine de stări intermediare (x_2), prin integrarea relației (88) după variabila x_2, putem scrie :

$$\int P(x_1,t_1;x_2,t_2;x_3,t_3)dx_2 \equiv P(x_1,t_1;x_3,t_3) = P(x_1,t_1)\int P(x_2,t_2/x_1,t_1)P(x_3,t_3/x_2,t_2)dx_2 \qquad (89)$$

Prin împărțirea relației (89) cu $P(x_1,t_1)$ și ținând cont de identitatea lui Bayes (39) ce definește relația dintre $P(x_3,t_3/x_1,t_1)$ (termen definit ca un '*conditional probability*') și $P(x_1,t_1;x_3,t_3)$ (termen definit ca un '*joint probability*'), obținem :

$$P(x_3,t_3/x_1,t_1)=\int P(x_2,t_2/x_1,t_1)P(x_3,t_3/x_2,t_2)dx_2 \qquad (90)$$

unde integrarea din membrul drept al ecuaţiei de mai sus se face peste toate valorile posibile ale lui (x_2).

Ecuaţia de mai sus (90) poartă numele de identitatea Chapman-Kolmogorov, şi este valabilă pentru probabilitatea tranziţiilor din orice proces stochastic Markovian. Se poate verifica uşor că probabilitatea tranziţiei (x,t/0,0) dată de soluţia ecuaţiei lui Langevin pentru timpi de observaţie mari (86) conferă proprietatea de 'proces Markov' pentru tranziţiile (x,t/0,0), din punct de vedere al analizei variabilei 'x'.

Dacă în ecuaţia Chapman-Kolmogorov utilizăm notaţiile ($\tau = t_2 - t_1$) şi ($\tau' = t_3 - t_2$), şi considerăm că valoarea probabilităţii tranziţiei între stările considerate nu depinde de momentul temporal particular 't_i' al stării iniţiale, ci doar de diferenţa temporală între starea finală 'j' şi cea iniţială 'i', ea (ecuaţia Chapman-Kolmogorov) se poate scrie astfel:

$$T_{\tau+\tau'}(x_3/x_1)=\int T_{\tau'}(x_3/x_2)T_{\tau}(x_2/x_1)dx_2 \qquad (91)$$

unde am folosit următoarea notaţie simplificatoare pentru valoarea probabilităţii tranziţiei ($1 \rightarrow 2$) ce are loc în intervalul de timp ($\tau = t_2 - t_1$):

$$P(x_2,t_2/x_1,t_1)=T_{\tau}(x_2/x_1) \qquad (92)$$

(pentru celelalte probabilităţi de tranziţie conţinute în relaţia 90, se utilizează expresii similare cu cea de mai sus – 92).

La limita când $\tau' \rightarrow 0$ şi în formulare diferenţială, forma ecuaţiei Chapman-Kolmogorov dată de (91) devine:

$$\frac{\partial}{\partial\tau}T_{\tau}(x_3/x_1)=\int\left\{W(x_3/x_2)T_{\tau}(x_2/x_1)-W(x_2/x_3)T_{\tau}(x_3/x_1)\right\}dx_2 \qquad (93)$$

unde am notat prin $W(x_3/x_2)$ probabilitatea pe unitate de timp ('*transition rate*') a tranziţiei ($2 \rightarrow 3$) şi prin $W(x_2/x_3)$ probabilitatea pe unitate de timp ('*transition rate*') a tranziţiei inverse ($3 \rightarrow 2$).

Această ecuaţie diferenţială (93) se numeşte ecuaţia Master; scrisă într-o altă formă, mai intuitivă, în care valoarea probabilităţii tranziţiei ($1 \rightarrow 3$) dată de $T_{\tau}(x_3/x_1)$ se notează cu $P(x,t)$ iar valoarea probabilităţii tranziţiei ($1 \rightarrow 2$) dată de $T_{\tau}(x_2/x_1)$ se notează cu $P(x',t)$, ecuaţia Master devine:

$$\frac{\partial}{\partial \tau} P(x,t) = \int \{W(x/x')P(x',t) - W(x'/x)P(x,t)\} dx' \qquad (94)$$

În ceea ce priveşte soluţia ecuaţiei Master, trebuie avut în vedere faptul că ea reflectă probabilitatea tranziţiei ($1 \rightarrow 3$) pentru orice stare iniţială ('1') considerată, şi nu probabilitatea ca la momentul 't_3' particula să se afle în starea 'x_3'. În cazul discret în care stările asumate de către sistem nu sunt distribuite continuu – cel mai simplu exemplu îl reprezintă tranziţiile posibile ale unei molecule între diferite stări conformaţionale – ecuaţia Master capătă în forma matricială expresia fundamentală pe care se bazează analiza cineticii chimice:

$$\frac{dP(t)}{dt} = P(t)Q \qquad (95)$$

unde elementele matricei P(t) ce reprezintă probabilităţile de tranziţie (categoria '*conditional probabilities*') de tip Markov ale moleculei studiate între stările moleculare (i) şi (j) în intervalul de timp cuprins între '0' şi 't' (specific, P_{ij}(t) = prob [*j* la *t* | *i* la *0*]). Alternativ, această ecuaţie (95) se deduce uşor, folosind următorul raţionament: pentru cazul simplificat – pe care, de altfel, îl vom aborda şi într-un capitol ulterior – în care există doar două stări între care au loc tranziţiile moleculare studiate (notate cu '1' şi '2'), iar k_{12} şi k_{21} reprezintă constantele de reacţie pentru tranziţiile între stările '1'→'2' şi, respectiv, '2'→'1', probabilităţile de tranziţie între stările respective în intervalul de timp '$\Delta\tau$' ($\Delta\tau \rightarrow 0$) sunt date prin definiţie de:

$$\begin{aligned} P_{11}(\Delta\tau) &= 1 - k_{12}\Delta\tau \\ P_{12}(\Delta\tau) &= k_{12}\Delta\tau \\ P_{21}(\Delta\tau) &= k_{21}\Delta\tau \\ P_{22}(\Delta\tau) &= 1 - k_{21}\Delta\tau \end{aligned} \qquad (96)$$

Atenţie: ecuaţiile de mai sus sunt valide şi exprimă probabilităţile de tranziţie respective în intervalul de timp '$\Delta\tau$', doar pentru $\Delta\tau \rightarrow 0$!! Pentru a determina probabilităţile de tranziţie ale moleculei studiate între stările moleculare (i) şi (j) în intervalul de timp 'macroscopic' cuprins între '0' şi 't', trebuie să urmărim expunerea de mai jos.

Aşa cum am precizat, în ecuaţiile (96), termenii $P_{ij}(\Delta\tau)$ (i, j=1..2) desemnează probabilităţile ca în intervalul de timp '$\Delta\tau$' molecula studiată să realizeze tranziţii între stările '1' şi, respectiv, '2', iar prin corespondenţă logică, termenii $P_{ii}(\Delta\tau)$ (i=1..2) desemnează probabilităţile ca în intervalul de timp '$\Delta\tau$', molecula

BUJAN CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

studiată să nu părăsească stările '1' şi, respectiv, '2'. Cu aceste ecuaţii şi utilizând regula de compunere a probabilităţilor, termenul $P_{11}(t+\Delta\tau)$ care desemnează probabilitatea ca molecula studiată să se găsească în starea '1' şi după intervalul de timp cuprins între '0' şi 't+Δτ', ştiind că la momentul '0', ea se afla în acea stare, este dat de $(P_{11}(\Delta\tau)P_{11}(t)+P_{21}(\Delta\tau)P_{12}(t))$. Altfel spus:

$$P_{11}(t+\Delta\tau)=(1-k_{12}\Delta\tau)P_{11}(t)+k_{21}\Delta\tau P_{12}(t) \qquad (96\text{ bis})$$

La limita Δτ→0, context pe care, de altfel, îl abordăm, ecuaţia de mai sus devine:

$$\lim_{\Delta\tau\to 0}\frac{P_{11}(t+\Delta\tau)-P_{11}(t)}{\Delta\tau}=\frac{dP_{11}(t)}{dt}=-k_{12}P_{11}(t)+k_{21}P_{12}(t) \qquad (97)$$

În mod asemănător, se pot scrie ecuaţii similare pentru termenii $P_{12}(t)$, $P_{21}(t)$ şi $P_{22}(t)$.

$$\begin{aligned}\frac{dP_{12}(t)}{dt}&=k_{12}P_{11}(t)-k_{21}P_{12}(t)\\ \frac{dP_{21}(t)}{dt}&=-k_{21}P_{11}(t)+k_{21}P_{22}(t)\\ \frac{dP_{22}(t)}{dt}&=k_{12}P_{21}(t)-k_{21}P_{22}(t)\end{aligned} \qquad (97\text{ bis})$$

Exprimând acest set de ecuaţii în formă matricială, obţinem tocmai ecuaţia (95), aplicată pentru un sistem molecular ce realizează tranziţii între doar două stări distincte.

$$\frac{d}{dt}\begin{bmatrix}P_{11}(t) & P_{12}(t)\\ P_{21}(t) & P_{22}(t)\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}P_{11}(t) & P_{12}(t)\\ P_{21}(t) & P_{22}(t)\end{bmatrix}\begin{bmatrix}-k_{12} & k_{12}\\ k_{21} & -k_{21}\end{bmatrix} \qquad (95\text{ bis})$$

Aşadar, în cazul general şi prin definiţie, termenii ($P_{ij}(\Delta\tau)$ = prob [j la $t+\Delta\tau$ | i la t] = $k_{ij}\Delta\tau$) au semnificaţia de '*conditional probabilities*' şi se referă la probabilităţile de tranziţie între stările 'i' şi 'j' în intervalul de timp 'Δτ' ($\Delta\tau\to 0$), iar probabilităţile (tot '*conditional probabilities*') ca acea moleculă să *nu* părăsească starea (i) în intervalul de timp cuprins între 't' şi 't +Δτ' ($\Delta\tau\to 0$) sunt date de $P_{ii}(\Delta\tau)$.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aşa după cum am anticipat anterior, parametrii k_{ij} reprezintă constantele de reacţie ale moleculei studiate pentru tranziţiile între stările 'i' şi 'j', şi sunt identice conceptual cu probabilităţile de tranziţie pe unitate de timp definite pentru cazul proceselor Markov continue ('*transition rate*'). În formă matricială, elementul 'Q' din ecuaţia 95 se scrie:

$$Q = \begin{bmatrix} q_{11} & q_{12} & q_{13} & q_{14} & q_{1n} \\ q_{21} & q_{22} & q_{23} & q_{24} & q_{2n} \\ q_{31} & q_{32} & q_{33} & q_{34} & q_{3n} \\ q_{41} & q_{42} & q_{43} & q_{44} & q_{4n} \\ q_{n1} & q_{n2} & q_{n3} & q_{n4} & q_{nn} \end{bmatrix} \tag{98}$$

Din expresiile scrise mai sus pentru cazul simplificat considerat (2 x 2 – doar două stări între care au loc tranziţiile moleculare studiate), se poate demonstra că în cazul general (n x n) matricea Q satisface următoarea expresie:

$$Q = \lim_{\Delta\tau \to 0} \left[\frac{P(\Delta\tau) - I}{\Delta\tau} \right] \tag{99}$$

unde I este matricea unitate.

Altfel spus, elementele matricei Q se formează calculând valorile $\frac{P_{ij}}{\Delta\tau}$ pentru termenii ne-diagonali ($i \neq j$) şi $\frac{P_{ij} - 1}{\Delta\tau}$ pentru termenii diagonali ($i = j$).

Este simplu de verificat că pentru orice 'i' suma valorilor pe coloane a matricei P este egală cu unitatea – la orice moment, molecula trebuie să se găsească în mod necesar în una din stările sale posibile:

$$\sum_{j=1}^{n} P_{ij} = 1, \quad i \in (1, n) \tag{100}$$

şi că suma valorilor pe coloane a matricei Q este nulă ; Q este deci o matrice singulară ($\det|Q| = 0$).

În formă matricială, soluţia ecuaţiei Master pentru tranziţiile moleculei studiate între stările posibile poate fi scrisă astfel:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$P(t) = e^{Qt} \tag{101}$$

deoarece P(0) = I. Datorită caracterului de procese Markov a tranziţiilor moleculare descrise, şi pentru condiţii iniţiale identice, trebuie menţionat că soluţia (101) este validă indiferent de momentul temporal ales drept 'origine'. Astfel, dacă alegem formal momentul iniţial 't_1' diferit de zero, probabilităţile de tranziţie (categoria '*conditional probabilities*') de tip Markov ale moleculei studiate între stările moleculare (i) şi (j) în intervalul de timp cuprins între 't_1' şi '$t_1 + t$' vor fi date tot de $P_{ij}(t)$ = prob [*j* la t_1+*t* | *i* la t_1] .

Pentru scopul nostru, putem defini şi o altă matrice p(t) de tip (1 x n):

$$p(t) = \left| p_1(t) \;\; p_2(t) \;\; p_3(t) \;\; p_4(t) \;\; p_5(t) \ldots\ldots p_n(t) \right| \tag{102}$$

dată de:

$$p_j(t) = \sum_{i=1}^{n} p_i(0) P_{ij}(t) \tag{103}$$

ale cărei elemente $p_j(t)$ reprezintă probabilităţile ca molecula studiată să fie într-o stare particulară (j) la momentul t.

În expresia de mai sus, $p_i(0)$ reprezintă probabilităţile ca la momentul iniţial (t = 0), molecula studiată să se afle în stările i $\in$(1... n). În forma matricială, pentru orice i, j $\in$(1..n), egalitatea de mai sus se poate scrie astfel :

$$p(t) = p(0)P(t) \tag{104}$$

Pentru un cercetător, probabilităţile ca molecula studiată să fie într-o stare particulară (j) la momentul (t) ce sunt date de expresia de mai sus, pot fi de mai mare interes decât elementele matricei P(t), ce reprezintă probabilităţile de tranziţie ale moleculei studiate între stările moleculare (i) şi (j) în intervalul temporal de la '0' la 't'. Asupra acestui subiect voi mai reveni în alt capitol, în care voi descrie analiza cinetică statistică a unui canal ionic. În particular şi cu relevanţă pentru cititor, dacă vom considera un ansamblu de 'N' particule microscopice identice şi independente, prin înmulţirea relaţiei de mai sus cu acest număr (i.e., N) determinăm legea fundamentală pentru descrierea macroscopică a cineticii oricărei reacţii chimice. După cum se observă din relaţia de mai sus, în urma unei perturbaţii impuse asupra unei molecule aflate într-o stare de echilibru oarecare la momentul iniţial, ea evoluează într-o nouă stare de echilibru şi cinetica probabilităţii de ocupare a oricărei stări particulare $p_j(t)$ finale descrie o lege temporală multiexponenţială.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dacă ne concentrăm atenția asupra procesului de mișcare browniană, în care variabila stochastică studiată este coordonata spațială 'x' a particulei, putem deduce o expresie mult mai abordabilă matematic pentru valoarea tranziției (1 → 3) dată de $T_\tau(x_3 / x_1)$ și notată cu $P(x,t)$. Astfel, dacă facem următoarele presupuneri de bază:

- în procesul de mișcare haotică a particulelor difuzante, particulele efectuează salturi mici în spațiu. Notând prin 'r' diferența între coordonata poziției inițiale și finale în cursul unui salt stochastic ($r = x - x_0$) și prin $W(x_0; r)$ probabilitatea de tranziție efectuată astfel încât, pornind din poziția x_0, lungimea saltului să fie r, afirmația de mai sus se exprimă matematic astfel:

$W(x_0; r) \sim 0$, pentru $|r| > \delta$

$W(x_0 + \Delta x; r) \sim W(x_0; r)$, pentru $|\Delta x| < \delta$

unde δ este un număr pozitiv.

- soluția ecuației Master P(x, t) variază foarte încet cu x, în același înțeles ca și condiția precedentă,

și utilizând notațiile pentru valorile medii și, respectiv, ale valorilor medii pătratice pe ansamble ale 'salturilor' realizate de particula studiată în intervalul de timp 'Δt' ce separă temporal cele două stări (inițială și, respectiv, finală):

$$a_1(x) = \lim_{\Delta t \to 0} \frac{\langle \Delta x \rangle}{\Delta t}$$
$$a_2(x) = \lim_{\Delta t \to 0} \frac{\langle (\Delta x)^2 \rangle}{\Delta t} \qquad (105)$$

se găsește că expresia ce descrie variația lui P(x, t)), descrisă inițial de forma diferențială a ecuației Chapman-Kolmogorov (ecuația Master), este soluția unei ecuații stochastice diferențiale de ordinul II, cu derivate parțiale, numită ecuația Fokker-Planck și care este mai ușor de rezolvat decât ecuația Master:

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}\{a_1(x)P(x,t)\} + \frac{1}{2}\frac{\partial^2}{\partial x^2}\{a_2(x)P(x,t)\} \qquad (106)$$

Trebuie să facem precizarea că deși am asociat până acum stările distincte ale particulei studiate cu valoarea coordonatei spațiale 'x', se poate utiliza în ecuația Master orice variabilă dorită de observator, prin intermediul căreia să se analizeze cantitativ procesul stochastic dat. Astfel, în expunerea referitoare la ecuația lui Langevin, una din aceste variabile a fost viteza particulei. Ecuația Fokker-Planck este

foarte importantă în descrierea statistică a proceselor stochastice microscopice şi constituie fundamentul altor teorii macroscopice de descriere fizică a ansamblelor microscopice (e.g., formula barometrică, distribuţia particulelor după energii etc.). Primul termen din partea dreaptă a ecuaţiei Fokker-Planck (106) se numeşte termen de transport (sau convecţie, sau drift), iar cel de-al doilea se numeşte termen de difuzie. O trăsătură foarte importantă a ecuaţiei Fokker-Planck se referă la valabilitatea ei şi pentru procesele stochastice neliniare şi nestaţionare, caracterizate prin neliniaritatea şi nestaţionaritatea coeficienţilor '*transition rate*' şi deci implicit a coeficienţilor $a_1(x)$ şi $a_2(x)$; trebuie însă reţinut că o condiţie esenţială trebuie totuşi îndeplinită de aceste procese, şi aceasta este caracterul lor markovian. Ecuaţia lui Langevin, pe de altă parte, se poate aplica, mai ales, pentru procese stochastice liniare (în sensul exprimat mai sus), însă valabilitatea ei se extinde şi pentru procese stochastice nemarkoviene, când funcţia de autocorelaţie a lui f(t) nu este de tip 'delta'. Din ce am prezentat mai sus, observăm că o calitate fundamentală a ecuaţiei lui Langevin este aceea că ajută la descrierea mişcării particulei browniene şi pentru timpi de observaţie foarte mici, când comportamentul ei nu este încă markovian din punct de vedere al variabilei 'x'; teoria Nernst-Planck este 'opacă' pentru această scală temporală! Este extrem de interesant de făcut următoarea observaţie: în funcţie de variabila stochastică analizată, mişcarea browniană poate fi considerată un proces Markov sau nu, şi respectiv un proces stochastic staţionar sau nu. Astfel, în contextul fizic prezentat la începutul acestui capitol, dacă încercăm caracterizarea procesului de mişcare browniană prin prisma variabilei stochastice 'v', relaţiile de mai sus cu privire la descrierea probabilistică a acestei variabile (teoria lui Langevin) demonstrează că acest proces este şi staţionar, şi de tip Markov. Dacă se încearcă însă caracterizarea cantitativă a mişcării browniene prin prisma variabilei stochastice 'x', acest proces stochastic este nestaţionar, iar caracterul său markovian depinde de scala temporală la care facem observaţii asupra coordonatei unei particule.

Aplicaţia cea mai comună de utilizare a ecuaţiei Fokker-Planck pentru evaluări cantitative, probabilistice, ale proceselor stochastice de tip Markov, se referă la studierea mişcării browniene libere. Doar pentru a reaminti contextul problemei, ne referim la o particulă ce se mişcă doar sub acţiunea interacţiunilor suferite din partea mediului extern, şi care la intervalele de timp t_1, t_2, ... t_i îşi modifică valorile x_{t1}, x_{t2}, ... x_{ti} ale coordonatei spaţiale, într-o manieră stochastică.

În acest caz, dintr-o primă analiză a ecuaţiei lui Langevin (49) ne amintim că pentru timpi de observaţie mari pentru care caracterul Markovian al variabilei 'x' – unde 'x' se referă specific la coordonata spaţială unidimensională a particulei difuzante – este respectat, valoarea mediată pe ansamble a vitezei particulei este nulă. Întrebarea pe care o punem este următoarea: dacă particula porneşte din punctul de coordonate $(x = 0, t = 0)$, care este probabilitatea ca la un timp oarecare 't' distanţa dintre poziţia iniţială şi poziţia curentă să fie 'x' ?

Dacă am urmări experimental particula noastră şi am face mai multe măsurători ale distanţei străbătute de la un punct ales drept origine în intervalul de timp 'Δt' ($\Delta t = t - 0$), vom obţine valori stochastice pentru mărimea 'Δx' ($\Delta x = x - 0$). Deoarece particula noastră se poate mişca în ambele sensuri ale axei spaţiale, valorile

mărimii 'Δx' pot fi şi pozitive, şi negative. Din ecuaţia lui Langevin, rezultă însă că viteza medie pe ansamble a particulei este nulă, şi deci valoarea mediată pe ansamble a mărimilor 'Δx' este nulă. Dacă facem în continuare presupunerea că intervalele temporale 'Δt' de observaţie a mărimilor 'Δx' sunt suficient de mici pentru ca ecuaţia Fokker-Planck să ne fie utilă pentru scopul definit anterior, şi ţinând cont că valoarea coeficientului a_1 devină nulă, următoarea ecuaţie diferenţială:

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = \frac{a_2}{2}\frac{\partial^2 P(x,t)}{\partial x^2} \tag{107}$$

descrie cantitativ probabilitatea ca la un timp oarecare 't', distanţa dintre poziţia iniţială şi poziţia curentă a particulei este 'x'.

Ca pentru orice ecuaţie diferenţială, soluţia ecuaţiei de mai sus depinde de condiţiile iniţiale şi pe frontieră ale problemei particulare studiate.

De remarcat că în cazul de faţă, valoarea coeficientului $a_2(x)$ este o mărime constantă – vezi argumentele de la descrierea ecuaţiei lui Langevin – şi de aceea am renunţat la descrierea sa ca o funcţie de 'x'. O altă calitate de analiză asociată folosirii ecuaţiei Fokker-Planck pentru descrierea mişcării browniene este că nu trebuie să facem nici o supoziţie prealabilă despre caracterul de staţionaritate al mărimii studiate, care să ne uşureze aplicaţia analitică; trebuie doar să specificăm faptul că studiem procesul la o scală temporală care să asigure caracterul de variabilă Markov a mărimii studiate.

Utilizând notaţia:

$$D = \frac{a_2}{2} = \frac{1}{2}\frac{\left\langle (\Delta x)^2 \right\rangle}{\Delta t} \tag{108}$$

şi presupunând că la momentul iniţial $t_0 = 0$, particula studiată se afla în punctul de coordonată $x_0 = 0$, probabilitatea tranziţiei (x,t/0,0) dată de soluţia ecuaţiei Fokker-Planck este:

$$P(x,t) = \frac{1}{4\pi Dt} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \tag{109}$$

Regăsim astfel rezultatul din aplicarea teoriei lui Langevin pentru evaluarea cantitativă a mărimii P(x, t), şi înţelegem mai bine afirmaţia făcută cu privire la caracterul markovian al mărimii observate 'x' pentru intervale mari de observaţie, pentru care viteza particulei nu mai este corelată cu ea însăşi. Astfel, aceste intervale mari de observaţie asigură mişcării browniene analizate prin prisma variabilei spaţiale 'x' proprietate markoviană, deoarece soluţia obţinută din rezolvarea ecuaţiei lui Langevin, în aceste condiţii, coincide cu soluţia rezultată din ecuaţia Fokker-Planck ce este aplicabilă doar pentru procese stochastice de tip Markov. Utilizând soluţia de mai

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sus pentru P(x, t), putem deduce uşor că valoarea deviaţiei standard a mărimilor 'Δx' măsurate la un timp oarecare 't' este dată de ecuaţia Einstein – Smoluchowski dedusă anterior (87) ($\sqrt{\langle(\Delta x)^2\rangle} = \sqrt{\langle x^2\rangle} = \sqrt{2Dt}$).

Astfel, pentru particula studiată, variabilele 'x' măsurate la un timp particular (t) sunt distribuite gaussian cu valoare medie nulă şi deviaţie standard dată de ecuaţia Einstein – Smoluchowski. Această ecuaţie este extrem de utilă pentru caracterizarea macroscopică a mişcării microscopice browniene, iar un aspect demn de reţinut este că, grosier vorbind, valorile deplasărilor individuale realizate la timpul (t) depind de rădăcina pătrată a intervalului temporal considerat. Astfel, dacă vom considera pentru coeficientul de difuzie (D) al unei particule difuzante o valoare de 10^{-6} cm^2s^{-1}, într-o aproximaţie destul de bună, rezultă că pentru a străbate o distanţă dintre punctul iniţial şi un punct final aflat la 1 cm, ar trebui să treacă un timp de 5×10^5 secunde!! Pe de altă parte, o distanţă de aproximativ 100 Å va fi străbătută în 0.5 μs. Putem aprecia deci că doar sub acţiunea mişcării dezordonate, browniene, transportul de masă are loc eficient doar pe distanţe extrem de mici; toţi ştim că pentru a obţine o bună omogenizare a zahărului în cafea, nu trebuie să ne bazăm doar pe mişcarea browniană a moleculelor de zahăr, ci trebuie să utilizăm şi o linguriţă care să creeze forţe hidrodinamice necesare să asigure transportul volumic al zahărului din ceaşcă în timpi scurţi (de obicei, până se răceşte cafeaua).

Tabel 4 Valori numerice, specifice, ale coeficienţilor de difuzie pentru diferite molecule aflate în aer şi medii apoase.

Molecula	Mediul	Temperatura (^{0} C)	M (g/mol)	D (cm^2/s)
Hidrogen	Aer	0	2	6.11×10^{-1}
Heliu	Aer	3	4	6.24×10^{-1}
Oxigen	Aer	0	32	1.78×10^{-1}
Benzen	Aer	25	78	9.60×10^{-2}
Hidrogen	Apa	25	2	4.50×10^{-5}
Heliu	Apa	25	4	6.28×10^{-5}
Oxigen	Apa	25	32	2.10×10^{-5}
Uree	Apa	25	60	1.38×10^{-5}
Benzen	Apa	25	78	1.02×10^{-5}
Sucroza	Apa	25	342	5.23×10^{-6}
Ribonucleaza	Apa	20	13.683	1.19×10^{-6}
Hemoglobina	Apa	20	68.000	6.90×10^{-7}
Catalaza	Apa	20	250.000	4.10×10^{-7}
Miozina	Apa	20	493.000	1.16×10^{-7}
ADN	Apa	20	6.000.000	1.30×10^{-8}
Virusul 'tutunului'	Apa	20	50.000.000	3.00×10^{-8}

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI FIZICĂ

Deşi simplu în formulare, acest rezultat exprimat de relaţia (Einstein – Smoluchowski – 87) este profund în implicaţii în ceea ce priveşte mişcarea browniană: chiar dacă viteza medie a particulei studiate este nulă, aceasta nu înseamnă că ea rămâne nemişcată. Caracterul de valoare nulă a vitezei medii este dat de faptul că particula se poate mişca în ambele sensuri ale axei spaţiale alese şi prin compunerea vectorilor viteză, obţinem o valoare nulă pentru media acestora. Este însă important de observat că mişcarea particulei are loc în aşa fel încât, pentru timpi de observaţie crescători, valoarea deviaţiei standard a mărimilor stochastice 'Δx' corespunzătoare devine din ce în ce mai mare. Altfel spus, particula browniană se va îndepărta de poziţia iniţială; pentru un interval 't' de măsurare a distanţelor relative 'x', acestea sunt valori stochastice, iar deviaţia lor standard – dată de formula de mai sus – va fi întotdeauna mai mare pe măsură ce intervalul temporal de observaţie se măreşte. Nu putem remarca aici dovada clară a faptului că prin prisma valorilor 'x', procesul stochastic studiat nu este staţionar şi deci ipoteza de ergodicitate nu poate fi acceptată în descrierea analitică a mişcării Browniene; varianţa tranziţiilor între un punct ales iniţial ('0') şi un punct final ('x') depinde de timp, aşa cum o arată soluţia ecuaţiei Fokker-Planck scrisă mai sus. În cazul particular în care particula Browniană difuzează sub acţiunea unei forţe externe 'F', pe care o presupunem, pentru a simplifica expunerea, ca fiind constantă în timp şi spaţiu, ecuaţia lui Langevin mediată pe ansamble se scrie:

$$m\frac{d\langle v\rangle}{dt} = -m\gamma\langle v\rangle + F \tag{110}$$

(semnificaţia termenilor este aşa cum a fost descrisă anterior).
Soluţia acestei ecuaţii diferenţiale, este de forma:

$$\langle v(t)\rangle = \frac{F}{m\gamma} + e^{-\gamma t}\,ct. \tag{111}$$

unde 'ct.' este o constantă de integrare ce se poate determina din condiţiile iniţiale ale ecuaţiei.

Tabel 5 Valori grosiere, calculate pe baza ecuaţiei Einstein – Smoluchowski, a deplasărilor unidimensionale ($x_{1/2}$) realizate de o particulă a cărei coeficient de difuzie este considerat a fi egal cu 10^{-5} cm^2/s, în intervale de timp specfice ($t_{1/2}$).

$x_{1/2}$	$t_{1/2}$	Exemple dimensionale proporţionale cu $x_{1/2}$
10 nm	100 ns	Grosimea membranei celulare
1 μm	1 ms	Mărimea mitocondriei
10 μm	100 ms	Dimensiunea unei celule mici de la mamifere
100 μm	10 s	Diametrul unei fibre musculare

$x_{1/2}$	$t_{1/2}$	Exemple dimensionale proporţionale cu $x_{1/2}$
250 μm	1 min	Raza unui axon de la 'squid giant'
1 mm	16.7 min	Jumătate din grosimea unui muşchi *sartorius* de la broască
5 mm	6.9 h	Raza unui folicul ovarian matur
2 cm	4.6 z	Grosimea unui miocard ventricular
1 m	31.7 ani	Lungimea unui nerv sau celulă musculară

Pentru intervale mari de observaţie (în sensul descris mai sus şi cu referinţă la Fig. 48) şi pentru care mişcarea particulei devine Markoviană din punct de vedere al observabilei 'x', factorul exponenţial din ecuaţia de mai sus tinde spre zero, iar expresia respectivă devine:

$$\langle v(t) \rangle = \lim_{\Delta t \to 0} \frac{\langle \Delta x \rangle}{\Delta t} = \frac{F}{m\gamma} \tag{112}$$

Astfel, coeficientul a_1 din ecuaţia Fokker-Planck devine:

$$a_1 = \lim_{\Delta t \to 0} \frac{\langle \Delta x \rangle}{\Delta t} = \frac{F}{m\gamma} = F\frac{D}{kT} \tag{113}$$

(am utilizat relaţia lui Einstein, de legătură între coeficientul de difuzie şi cel de frecare pentru descrierea mişcării particulei Browniene: $D = \frac{kT}{m\gamma}$).

În aceste condiţii, ecuaţia Fokker-Planck ce descrie mişcarea particulei browniene este de forma:

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = -F\frac{D}{kT}\frac{\partial P(x,t)}{\partial x} + D\frac{\partial^2 P(x,t)}{\partial x^2} \tag{114}$$

Această ecuaţie diferenţială de ordinul doi cu derivate parţiale, descrie mişcarea stochastică a unei particule browniene sub acţiunea unei forţe externe ('F'); soluţia sa reprezintă probabilitatea ca, pornind din punctul iniţial de coordonate (x_0, t_0)=(0, 0) particula să ajungă în punctul de coordonate (x,t).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4 DESCRIEREA MACROSCOPICĂ A MIŞCĂRII BROWNIENE. SOLUŢIA ECUAŢIEI DE DIFUZIE ÎN CAZURI PARTICULARE

Din punct de vedere experimental, ecuaţiile precedente obţinute cu privire la mişcarea stochastică a unei particule browniene în absenţa sau sub acţiunea unei forţe externe ('F'), sunt extrem de utile pentru modelarea microscopică a mişcării ionice prin nanopori sau canale ionice. Cu toate acestea, în experimente de electrofiziologie moleculară şi celulară – ca şi în fizica clasică, de altfel – toate mărimile măsurate sunt variabile macroscopice: curent electric, densitate de curent electric, concentraţie etc. Legile simple ale circuitelor electrice (legea lui Ohm, legile lui Kirchoff) care au fost esenţiale şi pentru construcţia computerului utilizat pentru editarea acestei cărţi sunt legi macroscopice; ar fi fost destul de greu elaborarea conceptelor de circuit operaţional sau microprocesor doar pe baza cunoaşterii legităţilor ce guvernează mişcarea Browniană a doar unui electron dintr-un conductor! Fenomenul macroscopic în a cărui descriere cantitativă suntem interesaţi în acest capitol se referă la difuzia unor particule considerate identice şi independente într-un mediu în care există un gradient de concentraţie şi, opţional, o forţă externă constantă. Pentru aceasta este necesar să realizăm o modificare parţială a limbajului ştiinţific utilizat: în loc să operăm cu noţiunea de 'probabilitate' de localizare a unei singure particule într-un punct oarecare din spaţiu la un timp dat, va trebui să ne referim la evaluarea concentraţiei particulelor într-un anumit punct din spaţiu, la un timp definit. După cum este bine ştiut, prin definiţie, noţiunea de concentraţie se referă la numărul mediu de particule dintr-un volum dat.

Astfel, dacă notăm prin N_0 numărul mediu de particule ce traversează planul cu secţiunea considerată unitară, situat în punctul de coordonată (x_0) la momentul ales iniţial (t_0) şi alegem distanţa (dx) în aşa fel încât particulele să fie distribuite cu concentraţie constantă între cele două plane situate între x şi x + dx (Fig. 49), putem defini probabilitatea ca orice particulă ce porneşte la momentul iniţial din planul situat la distanţa x_0 să ajungă după timpul ('t') în spaţiul cuprins între distanţa x şi x + dx:

$$dP(x,t) = P(x,t)dx \tag{115}$$

unde P(x, t) are semnificaţia descrisă până acum.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Este important de menționat că distanța dx este aleasă în așa fel încât concentrația particulelor să fie constantă în acel inter-spațiu și notată prin C(x, t); altfel spus:

$$N(x+dx) = N(x) + C(x,t)dx \tag{116}$$

($N(x+dx)$ și, respectiv, $N(x)$ reprezintă numerele medii de particule difuzante în punctele de coordonate 'x' și, respectiv, 'x + dx')

În termeni probabilistici, numărul de particule ce ajung prin procesul mai sus definit în planul cuprins între distanța x și x + dx după timpul ('t'), și care provin doar din planul situat la distanța (x_0) este dat de:

$$dN(x,t) = N(x_0,t_0)P(x,t)dx \tag{117}$$

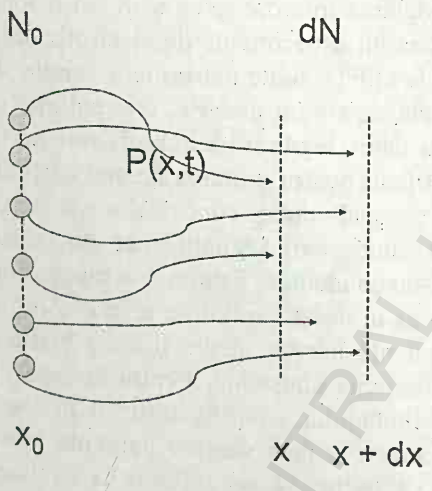


Figura 49 Reprezentare simplificată a traiectoriilor posibile ale unor particule difuzante ce se găsesc inițial doar în planul desemnat de 'x_0'; după un timp oarecare 't', o particulă se poate găsi distribuită între planurile 'x' și 'x+dx' cu o probabilitate dată de relația 107.

Prin împărțirea relației de mai sus cu 'dx', obținem tocmai valoarea concentrației C(x, t) în interspațiul cuprins între distanța x și x + dx la momentul de timp t:

$$C(x,t) = N(x_0,t_0)P(x,t) \tag{118}$$

Dacă înmulțim ecuația Fokker-Planck (107) pentru descrierea mișcării browniene libere, cu '$N(x_0, t_0)$', obținem:

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} N(x_0,t_0) = D \frac{\partial^2 P(x,t)}{\partial x^2} N(x_0,t_0) \tag{119}$$

BCU IAȘI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Scrisă într-o formă echivalentă şi cu definiţiile de mai sus, această ecuaţie ne dă informaţii despre modificările spaţio-temporale ale concentraţiei particulelor difuzante:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \tag{120}$$

Trebuie să reţinem un amănunt important: soluţia unică a acestor ecuaţii descrie concentraţia particulelor difuzante în punctul de coordonate (x, t) cunoscând nu doar condiţiile la limitele spaţiale, dar şi descrierea iniţială a distribuţiei de substanţă în spaţiul considerat (C(x, 0) = f(x) la 't' = 0). Astfel, din considerente strict microscopice de descriere a mişcării browniene, am dedus o lege macroscopică foarte importantă, cunoscută şi sub denumirea de legea a II-a a lui Fick. Cu ajutorul ecuaţiei 114, se poate verifica simplu că în cazul general, când difuzia particulelor are loc şi sub acţiunea unei forţe externe (F), ecuaţia de mai sus devine:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = -F\frac{D}{kT}\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} + D\frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \tag{121}$$

care se mai numeşte şi ecuaţia lui Smoluchowski.

Dacă folosim în continuare relaţia macroscopică de legătură între fluxul de substanţă difuzantă şi concentraţia sa în punctul (x, t), ce exprimă legea de conservare a substanţei în timpul procesului de difuzie – forma integrală a ecuaţiei clasice de continuitate – dată de:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial J(x,t)}{\partial x} \tag{122}$$

şi legea a II-a a lui Fick, obţinem relaţia de legătură între fluxul de substanţă transportată şi gradientul de concentraţie care determină transportul net de substanţă în spaţiul considerat:

$$J(x,t) = -D\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \tag{123}$$

Rămâne la latitudinea cititorului să interpreteze fizic semnificaţia semnului '-' din ecuaţia de mai sus, denumită şi legea I a lui Fick.

Ecuaţia generalizată a legii a II-a a lui Fick se mai poate scrie:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x}\left\{-F\frac{D}{kT}C(x,t) + D\frac{\partial C(x,t)}{\partial x}\right\} \tag{124}$$

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prin folosirea ecuației de continuitate scrisă mai sus, obținem o altă relație importantă ce completează legea I-a a lui Fick, în sensul că descrie cantitativ fluxul de substanță ce este prezent în mediul studiat atât sub acțiunea unui gradient de concentrație, cât și a unei forțe externe 'F':

$$J(x,t) = F\frac{D}{kT}C(x,t) - D\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \qquad (125)$$

Este poate util aici, ca făcând apel la noțiunile dezvoltate pe parcursul acestui capitol, să facem o clasificare comprehensivă a proceselor de difuzie. Astfel, soluția generală a legii a II-a a lui Fick va depinde de coordonata temporală și cea spațială; în acest caz, spunem că soluția respectivă reflectă un caz nestaționar.

Pentru timpi de observație foarte mari însă, se pot distinge următoarele situații:

a. ca urmare a desfășurării procesului de difuzie, substanța difuzantă devine distribuită uniform în tot spațiul de difuzie și deci gradientul de concentrație devine nul oriunde în acel spațiu. Drept urmare, se atinge așa-numita stare de echilibru caracterizată macroscopic de o valoare nulă a fluxului net de substanță transportată.
b. dacă printr-un procedeu extern se mențin gradienți de concentrație care să asigure un transport net de substanță în mediul considerat, iar variația în timp a concentrației de substanță devine nulă, se obține starea de staționaritate, caracterizată de următoarele condiții:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = 0$$
$$J(x,t) = cons\tan t \neq 0$$

Utilizând ecuația de continuitate și legea I-a a lui Fick, este ușor de verificat că în starea staționară, valoarea fluxului de substanță este constantă în raport cu spațiul și timpul.

Cea de-a 3-a posibilitate se referă la starea cvasi-staționară, în care valoarea concentrației de substanță variază în timp, însă rata sa de schimbare este foarte mică, în raport cu cinetica procesului studiat, încât pentru intervale mici de observație se poate considera că sistemul se află într-o aproximativă stare staționară; această situație este extrem de utilă pentru descrierea proceselor de difuzie prin biomembrane, așa după cum vom demonstra ulterior.

În cazul particular și cu relevanță pentru electrofiziologia moleculară, în care forța externă 'F' ce se exercită asupra fiecărei particule difuzante provine dintr-un câmp conservativ caracterizat de potențialul electric V(x), putem scrie:

$$X = -ze^{-}\frac{\partial V(x)}{\partial x} = -\frac{\partial U(x)}{\partial x} \qquad (126)$$

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(în această ecuaţie, U(x) reprezintă energia potenţială electrică a sarcini electrice 'ze' în câmpul conservativ caracterizat de potenţialul V(x)).

Astfel, ecuaţia generalizată a legii a II-a a lui Fick se mai poate scrie:

$$J(x,t) = -BC(x,t)\frac{\partial U(x)}{\partial x} - D\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \tag{127}$$

şi este cunoscută sub numele de ecuaţia Nernst-Planck. În această ecuaţie, 'B' se numeşte mobilitatea mecanică a particulelor difuzante şi prin definiţie este dată de:

$$B = \frac{1}{m\gamma} = \frac{D}{kT} \tag{128}$$

Utilizând identitatea matematică:

$$\frac{\partial}{\partial x}\left\{C(x,t)e^{\frac{U(x)B}{D}}\right\} = \frac{\partial C(x,t)}{\partial x}e^{\frac{U(x)B}{D}} + \left(\frac{B}{D}\right)C(x,t)e^{\frac{U(x)B}{D}}\frac{\partial U(x)}{\partial x} \tag{129}$$

şi prin înmulţirea ecuaţiei generalizată a legii a II-a a lui Fick de mai sus cu factorul $e^{\frac{U(x)B}{D}}$ obţinem:

$$J(x,t)e^{\frac{U(x)B}{D}} = -D\frac{\partial}{\partial x}\left\{C(x,t)e^{\frac{U(x)B}{D}}\right\} \tag{130}$$

Aşa după cum vom vedea în capitolele următoare, făcând anumite presupuneri restrictive, dar într-o relativă bună concordanţă cu realitatea asupra formei de variaţie spaţială a fluxului de particule difuzante, această ecuaţie va deveni fundamentală pentru cuantificarea fluxului de materie transportat prin nanopori sub acţiunea unui câmp electric. Această ecuaţie permite descrierea matematică cantitativă completă a mişcării browniene a ionilor prin canale ionice, ce are loc într-un câmp de forţe externe şi sub acţiunea unor forţe de 'frecare' (descrise de D), ce iau naştere din coliziunile aleatorii între particule în procesul de difuzie. În cazul membranelor biologice, valoarea potenţialului electric (V(x)) la care are loc procesul de difuzie poate căpăta forme analitice complicate, rezultând din următoarele consideraţii:

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. prezența ionilor difuzanți, precum și a altor reziduuri aminoacidice ce constituie parte structurală a porului canalului ionic (având sarcină netă electrică sau caracter dipolar), poate perturba semnificativ valoarea câmpului electric local E(x);

b. prezența sarcinilor electrice nete superficiale ale biomembranei complică suplimentar forma funcției E(x) la interfața soluție electrolitică – por.

În aceste condiții, pe lângă ecuația Nernst-Planck, mai este nevoie și de o altă ecuație (ecuația lui Poisson) pentru a rezolva problema difuziei ionice prin canalul ionic:

$$div\,E(x) = \frac{\rho(x)}{\varepsilon_0 \varepsilon_r(x)}$$

$$\rho(x) = \sum_k (e^- z_{+k} C_{+k}(x) + e^- z_{-k} C_{-k}(x)) + \sum_i e^- z_i P_i(x) \qquad (131)$$

unde:

- ε_0 este permitivitatea electrică a vidului;
- ε_r este permitivitatea electrică relativă a mediului de permeație ionică pe care, pentru a surprinde generalitatea problemei, o considerăm variabilă în raport cu distanța în interiorul căii de permeație ionică;
- $C_{+k}(x)$, z_{+k} sunt concentrația, respectiv valența ionilor permeanți pozitivi la distanța (x) în canalul ionic (analog pentru ionii negativi, $C_{-k}(x)$, z_{-k});
- $P_i(x)$ reprezintă contribuția speciei ionice (i) a porului permeant (i.e., ce rezidă în structura electrică a aminoacizilor ce formează porul permeant) la densitatea de sarcină totală – concept echivalent cu sarcina electrică permanentă a porului.

Ecuația lui Nernst-Planck, împreună cu ecuația lui Poisson formează un sistem complet de ecuații diferențiale cuplate (ecuațiile Nernst-Planck-Poisson). Rezolvarea acestui sistem de ecuații cu condiții la limită cunoscute (e.g., distribuția de sarcină electrică în porul canalului ionic, cunoașterea topologiei canalului ionic) conduce la determinarea soluției unice a fluxului ionic prin canale ionice. Este important de menționat că ecuațiile Nernst-Planck-Poisson pot descrie complet fenomenul de permeație ionică în modelul continuu. Astfel, dacă proprietățile fizice ale respectivului canal ionic și ale ionilor permeanți sunt cunoscute, și dacă valoarea diferenței de potențial transmembranar este definită, valoarea curentului electric mediat de respectivul canal ionic se poate deduce din rezolvarea ecuațiilor mai sus amintite. Pentru o astfel de încercare, nu trebuie uitat însă că din punct de vedere fizic și cu relevanță pentru problema noastră, canalul ionic trebuie să fie descriptibil în termeni de distribuție de sarcină electrică; cu alte cuvinte, trebuie să avem informații care să ne permită cunoașterea exactă a termenului $\rho(x)$. Ca orice lege fizică, și legea lui Coulomb poate da predicții bune în condițiile în care distribuția de sarcină electrică în sistem este cunoscută. În cazul în care aproximații mai mult sau mai puțin grosiere nu sunt implementate, cunoașterea precisă a termenului $\rho(x)$ poate fi o sarcină destul de dificilă. Ea ar presupune cunoașterea de informații despre cum anume este distribuită densitatea de sarcină electrică fixă în structura canalului ionic – rezultate date de cristalografia proteică – precum și descifrarea legităților, după care distribuții de

sarcină variabile în timp şi spaţiu, cum ar fi deplasarea ionilor permeanţi prin canalul ionic, induc alterări ale altor distribuţii de sarcină ale structurii studiate. Este extrem de important de reţinut că prin intermediul variabilelor de mai sus, profilul potenţialului electric (V(x)) printr-un canal ionic este o funcţie extrem de 'sensibilă' de concentraţia ionilor permeanţi, de diferenţa de potenţial aplicată din exterior şi de alterări de structură ale canalului ionic. Putem aprecia deci că acest profil de potenţial electric nu este o funcţie constantă, ci puternic dependentă de coordonatele spaţiale şi temporale, precum şi de condiţiile fizico-chimice specifice ale problemei studiate. În rezolvarea ecuaţiilor Nernst-Planck-Poisson, trebuie ţinut seama de faptul că nici valoarea profilului de potenţial şi nici valoarea densităţii de sarcină ionică ce caracterizează modelul prezentat nu pot fi consideraţi ca parametri independenţi; aceşti parametri trebuie calculaţi împreună, ca şi soluţie self-consistentă a acestor ecuaţii. În cea mai simplă abordare teoretică, ecuaţiile Nernst-Planck-Poisson sunt implementate presupunând că fluctuaţiile de densitate de sarcină electrică sunt mediate pe timpi relevanţi pentru procesele de transport ionic (10^{-5} – 10^{-3} secunde), generând astfel un profil de potenţial electric cvasi-staţionar prin porul permeant, iar interacţiunile între ionii permeanţi sunt ignorate (aşa-numita '*mean field hypothesis*'). De asemenea, ecuaţiile Nernst-Planck-Poisson nu ar putea fi rezolvate unic, dacă nu ştim condiţiile electrice la limitele geometrice ale canalului ionic studiat. Aşa cum este scrisă în formă diferenţială, ecuaţia lui Poisson aplicată pentru studiul procesului de permeaţie printr-un model de canal ionic necesită cunoaşterea distribuţiei de potenţial electric la limitele geometrice ale structurii modelate – acest aspect este uşor controlabil, mai ales în contextul de tip '*voltage-clamp*', în care valoarea potenţialului electric la limitele canalului ionic sunt fixate şi deci cunoscute *ab-initio*. Din nefericire, la nivel atomic, informaţiile structurale pentru cei mai mulţi dintre nanoporii biologici şi canale ionice care să permită 'maparea' densităţii de sarcină electrică în interiorul porului permeant sunt foarte puţine. De asemenea, nu multe sunt informaţiile despre proprietăţile dielectrice ale acestor proteine cu rol în transportul ionic prin biomembrane; de aceea, în multe încercări de rezolvare a ecuaţiilor Nernst-Planck-Poisson se presupune că valoarea permitivităţii electrice relative în interiorul porului permeant este ~ 80 – identică cu a apei – iar valoarea permitivităţii electrice relative a proteinei este ~ 2. Astfel, profilul de densitate de sarcină electrică trebuie, mai degrabă, evaluat pe baza ecuaţiilor Nernst-Planck-Poisson şi utilizând informaţiile experimentale referitoare la transportul ionic mediat de aceste structuri proteice. Rezolvarea setului de ecuaţii Nernst-Planck-Poisson este extrem de mult facilitată de implementarea unui algoritm specific ('*Gummel iteration*') 'împrumutat' din fizica semiconductorilor. Esenţa acestui algoritm este următoarea: iniţial, este propus un profil de densitate de sarcină electrică fixă prin por – $P_i(x)$ – şi un profil de potenţial electric care trebuie doar să satisfacă condiţiile la limită ale problemei studiate. Cu acest profil electric şi pe baza ecuaţiilor Nernst-Planck-Poisson, se calculează profilele de concentraţie $C_{+k}(x)$, $C_{-k}(x)$; ulterior, aceste profile de concentraţie sunt utilizate pentru a evalua, pe baza ecuaţiei lui Poisson, un nou profil de potenţial electric prin por. Acest proces iterativ se continuă până când se obţine o convergenţă a soluţiilor succesive, iar în final se obţin valori modelate ale concentraţiei ionilor difuzanţi prin

por, precum şi ale profilului de potenţial electric ce satisfac condiţiile la limită ale problemei propuse. Cu aceste informaţii, setul de ecuaţii Nernst-Planck-Poisson poate fi utilizat pentru a prezice seturi de valori curent – tensiune, aşa cum sunt observate experimental şi, în acest caz, spunem că am rezolvat 'problema Nernst-Planck-Poisson directă' (Fig. 50).

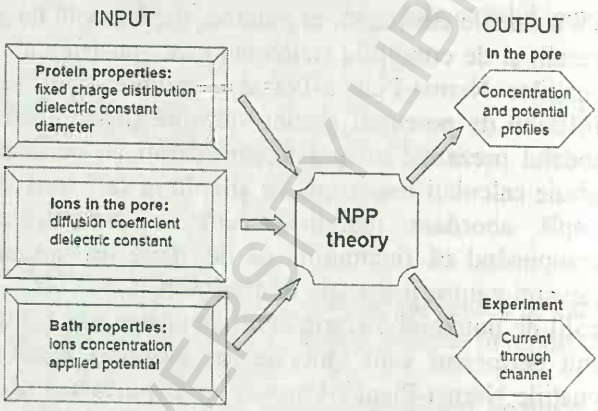


Figura 50 Reprezentarea schematizată a formalismului asociat cu rezolvarea problemei Nernst-Planck-Poisson directe.

În cele mai multe situaţii însă, lipsa informaţiilor date de experimente de cristalografie proteică nu permit identificarea distribuţiilor de sarcină electrică prin porul permeant al canalului ionic studiat. În aceste cazuri, se utilizează aşa-numitul formalism 'Nernst-Planck-Poisson invers', în care, printre datele esenţiale de la intrare, utilizatorul introduce valori experimentale din diagramele curent-tensiune, iar utilizarea ecuaţiilor Nernst-Planck-Poisson poate da informaţii despre $\rho(x)$ şi $V(x)$ (Fig. 51).

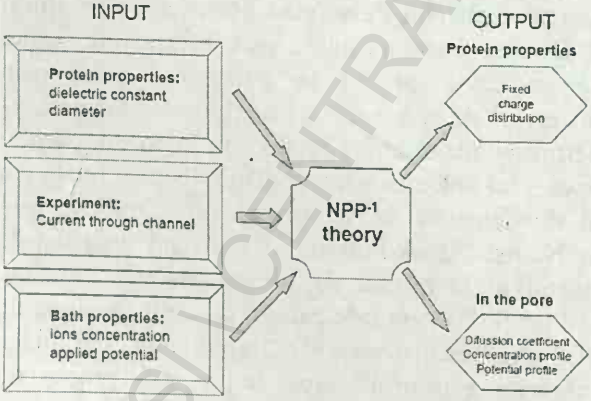


Figura 51 Reprezentarea schematizată a formalismului asociat cu rezolvarea problemei Nernst – Planck - Poisson inverse.

Pentru aprecierea cantitativă a calităţii modelului astfel propus, ecuaţiile Nernst-Planck-Poisson sunt, în continuare, utilizate pentru a prezice acum forma diagramelor curent-tensiune pentru alte situaţii experimentale; printr-un algoritm continuu de testare a informaţiilor prezise despre $\rho(x)$ şi $V(x)$ cu date experimentale constituite de diagrame curent-tensiune obţinute în condiţii experimentale controlabile,

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

se poate ajunge, în final, la o expresie cât mai conformă cu realitatea a distribuţiei de sarcină şi de potenţial electric prin canalul ionic studiat.

4.1 Sursa punctuală de particule difuzante

Caracteristic acestui caz particular este următoarea stare de lucruri: dacă pentru $t < 0$ spaţiul difuzant este lipsit de orice particule, iar la momentul $t = 0$ în punctul iniţial de coordonată x_0 este adusă o cantitate medie de 'N' particule pe unitatea de arie de substanţă confinată doar în planul situat în această coordonată, întrebarea pe care o punem este următoarea: care este distribuţia spaţio-temporală a concentraţiei particulelor, după ce sistemul de mai sus este lăsat să evolueze liber, fără contribuţia unor acţiuni externe ?

Matematic, problema de mai sus se reduce la a determina soluţia ecuaţiei:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \tag{132}$$

cu următoarele condiţii iniţiale:

- când $t < 0$, $C(x, t) = 0$ pentru orice $x \in (-\infty, \infty)$
- când $t > 0$

$$C(x,t) = \frac{\partial C(x,t)}{\partial x} = 0$$

la:

$x \to \infty$

$x \to -\infty$

În condiţiile explicate mai sus, concentraţia iniţială de substanţă se poate scrie astfel:

$$C(x,0) = N\delta(x) \tag{133}$$

unde $\delta(x)$ este funcţia 'delta' cu următoarele proprietăţi:

$$\delta(x - x_0) = 0, x \neq x_0$$
$$\int_{x_0-\varepsilon}^{x_0+\varepsilon} \delta(x - x_0)dx = 1 \tag{134}$$

pentru orice valoare a lui ε, oricât de mică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Una din cele mai elegante metode de rezolvare a ecuației de mai sus utilizează operatorul de transformare Fourier. În raport cu variabila 'x', relația de transformare Fourier integrală pentru funcția C(x, t) este dată de:

$$C_F(\zeta,t)=\int_{-\infty}^{\infty}C(x,t)e^{-j\zeta x}dx \tag{135}$$

Utilizând proprietățile operatorului de transformare Fourier integrală în raport cu operatorul de derivare în raport cu variabila 'x', şi prin înlocuire în ecuația de difuzie ce este înmulțită în prealabil cu factorul $\left(e^{-j\zeta x}\right)$ şi apoi integrată tot în raport cu variabila 'x' între (-∞,∞) , obținem:

$$\frac{\partial C_F(\zeta,t)}{\partial t}=-D\zeta^2C_F(\zeta,t) \tag{136}$$

În raport cu variabila temporală, ecuația diferențială de mai sus are soluția:

$$C_F(\zeta,t)=Ae^{-D\zeta^2t} \tag{137}$$

Din condițiile inițiale ale problemei noastre (t = 0), se poate deduce că valoarea constantei de integrare 'A' este egală cu 'N'. Astfel, soluția de mai sus se scrie:

$$C_F(\zeta,t)=Ne^{-D\zeta^2t} \tag{138}$$

Utilizând operatorul de transformare Fourier inversă în raport cu variabila 'x', obținem:

$$C(x,t)=\frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{\infty}C_F(\zeta,t)e^{jx\zeta}\,d\zeta=\frac{N}{2\pi}\int_{-\infty}^{\infty}e^{-D\zeta^2t+jx\zeta}\,d\zeta \tag{139}$$

Ținând cont de faptul că C(x, t) este o funcție reală, expresia de mai sus se scrie:

$$C(x,t)=\frac{N}{2\pi}\int_{-\infty}^{\infty}e^{-D\zeta^2t}\cos(x\zeta)d\zeta \tag{140}$$

Prin integrare, obținem pentru C(x, t) expresia:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$C(x,t)=\frac{N}{\sqrt{4\pi Dt}}e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \qquad (141)$$

În figura de mai jos, este reprezentat modul de variaţie spaţio-temporală a concentraţiei particulelor din contextul problemei discutate; aşa cum sugerează şi soluţia ecuaţiei ce descrie acest proces, distribuţia spaţială a concentraţiei particulelor difuzante la un timp stabilit este de formă gaussiană, iar odată cu trecerea timpului se produce o lărgire a deviaţiei standard a respectivei distribuţii.

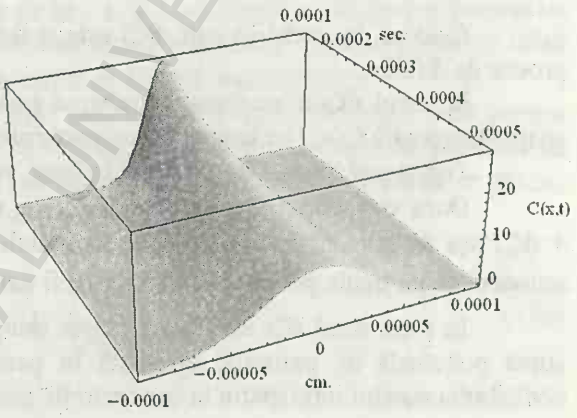


Figura 52 Modul de variaţie spaţio-temporală a concentraţiei particulelor confinate iniţial doar în planul asociat cu punctul de coordonată x = 0. Coeficientul de difuzie al particulelor difuzante s-a considerat a fi egal cu 10^{-6} cm^2 s^{-1}.

4.2 Caracterizarea difuziei induse dintr-un semi-spaţiu

Această situaţie generalizează cazul prezentat anterior, în sensul că presupunem o anumită formă analitică pentru distribuţia iniţială de concentraţie (Fig. 53):

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$C(x,0) = C(\zeta,0) = f(\zeta)$$
$$\zeta \in (-\infty,\infty), t = 0 \qquad (142)$$

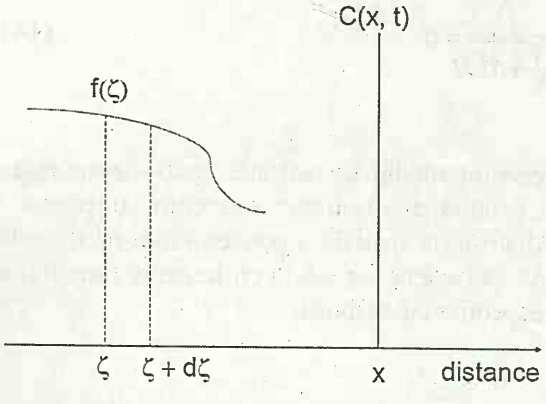


Figura 53 Reprezentarea simplificată a difuziei unor particule dintr-un semispațiu, în care forma analitică pentru distribuția inițială de concentrație este oarecare f(ζ).

Evident, în cazul în care f(ζ) este o funcție constantă în spațiu, nu va exista proces de difuzie.

În cazul expus mai sus, întrebarea pusă este următoarea: care va fi variația spațio-temporală C(x, t) a concentrației particulelor în spațiul considerat ?

Pentru a răspunde la această întrebare, raționamentul se desfăşoară astfel:

Dacă vom considera un inter-spațiu cu secțiune unitară cuprins între (ζ_i) și (ζ_i + $d\zeta_i$) așa de mic încât concentrația particulelor să fie constantă în această regiune, numărul de particule pe unitatea de arie va fi dat de $f(\zeta_i)d\zeta_i$.

În plus, dacă $d\zeta_i$ este făcut foarte mic, acest inter-spațiu se va comporta ca sursă punctuală de particule discutată în paragraful precedent. În aceste condiții, contribuția acestui interspațiu la concentrația particulelor în punctul 'x' este dată de

$$dC_i(x,t) = \frac{f(\zeta_i)d\zeta_i}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{(x-\zeta_i)^2}{4Dt}} \qquad (143)$$

Deoarece ecuația de difuzie este o ecuație liniară, un domeniu spațial oarecare cuprins între ($a < \zeta < b$) cu 'n' inter-spații identice fiecare cu grosimea $d\zeta_i$ va da pentru concentrația particulelor în punctul 'x' şi momentul 't' o valoare totală egală cu suma contribuțiilor individuale ale fiecărui inter-spațiu din cele 'n', așa cum este exprimat mai jos:

BCU "Ion Ionescu de la Brad" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\sum_{i=1}^{n} dC_i(x,t) = \sum_{i=1}^{n} \frac{f(\zeta_i)d\zeta_i}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{\left(x-\zeta_i\right)^2}{4Dt}} \tag{144}$$

La limita $d\zeta_i \to 0$ (şi deci $n \to \infty$), suma de sus se transformă în integrala:

$$C(x,t) = \int_a^b \frac{f(\zeta)}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{(x-\zeta)^2}{4Dt}} d\zeta \tag{145}$$

Extinzând limitele de integrare de la $-\infty$ la $+\infty$, obţinem valoarea expresiei ce descrie variaţia spaţio-temporală a concentraţiei particulelor difuzante, atunci când distribuţia lor iniţială este arbitrară şi descrisă de funcţia analitică $f(\zeta)$.

Cu privire la cazul discutat mai sus, există o particularizare utilă pentru biofizică, a cărei înţelegere poate facilita explicarea apariţiei diferenţei de potenţial de difuzie. Astfel, dacă se consideră că la momentul iniţial particulele difuzante se găsesc doar în semispaţiul cuprins între $-\infty$ şi originea axei spaţiale:

$$C(x,0) = f(\zeta) = \begin{cases} C_0, x \in (-\infty, 0) \\ 0, x > 0 \end{cases} \tag{146}$$

formula de mai sus (145) devine:

$$C(x,t) = \int_{-\infty}^{0} \frac{C_0}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{(x-\zeta)^2}{4Dt}} d\zeta \tag{147}$$

Utilizând schimbarea de variabilă:

$$u = \frac{x-\zeta}{\sqrt{2Dt}} \tag{148}$$

integrala de mai sus devine:

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$C(x,t)=\frac{2C_0}{\sqrt{4\pi}}\int_{\frac{x}{\sqrt{4Dt}}}^{\infty} e^{-u^2}\,du=\frac{C_0}{2}Erfc\left\{\frac{x}{\sqrt{4Dt}}\right\} \tag{149}$$

unde 'Erfc' se referă la o funcție extrem de întâlnită în teorii ale proceselor probabilistice, denumită '*complementary error function*' şi definită astfel:

$$Erfc(x)=\frac{2}{\sqrt{\pi}}\int_{x}^{\infty} e^{-u^2}\,du \tag{150}$$

Din figura de mai jos (Fig. 54), se observă că în condițiile inițiale abordate, odată cu trecerea timpului, particulele difuzante se distribuie în întreg spațiul cuprins între - ∞ şi + ∞, în aşa fel încât față de un plan imaginar ce trece prin originea axei spațiale alese şi perpendicular pe această axă, concentrația particulelor este distribuită simetric:

$$\frac{C_0}{2}-C(x,t)=C(-x,t)-\frac{C_0}{2} \tag{150 bis}$$

pentru orice 't'.

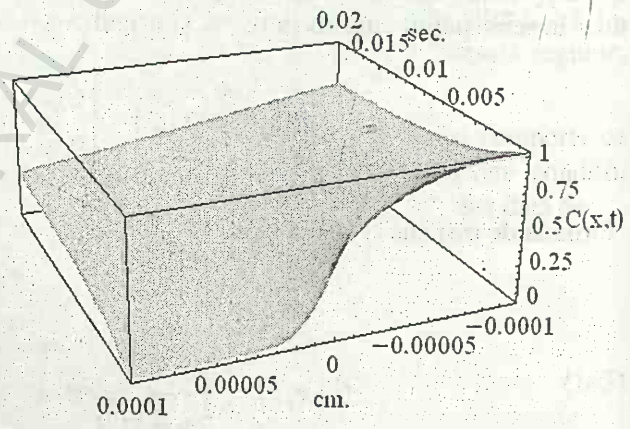


Figura 54 Reprezentarea grafică a soluției ecuației de difuzie (149) în cazul în care la momentul inițial particulele difuzante se găsesc doar în semispațiul cuprins între -∞ şi originea axei spațiale. Coeficientul de difuzie al particulelor difuzante s-a considerat a fi egal cu 10^{-6} cm^2 s^{-1}, iar C_0 egal cu unu.

Este intersant de observat că pe toată durata desfăşurării procesului de egalizare a concentrațiilor între cele două semi-spații (t → ∞), când întregul sistem ajunge la echilibru, valoarea concentrației substanței difuzante în planul ce trece prin originea axei spațiale este constantă şi egală cu jumătate din concentrația inițială.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.3 Caracterizarea difuziei într-un domeniu spaţial limitat, mărginit de valori constante ale concentraţiei particulelor difuzante

Acest caz (Fig. 55) este descris de o regiune spaţială cu grosimea 'h', pentru care:

$$\begin{cases} C(x,0)=0, x\in(0,h), t=0 \\ C(x,t)=ct.=C_0, x\in(-\infty,0), t>0 \\ C(x,t)=ct.=0, x\in(x,\infty), t>0 \end{cases} \quad (151)$$

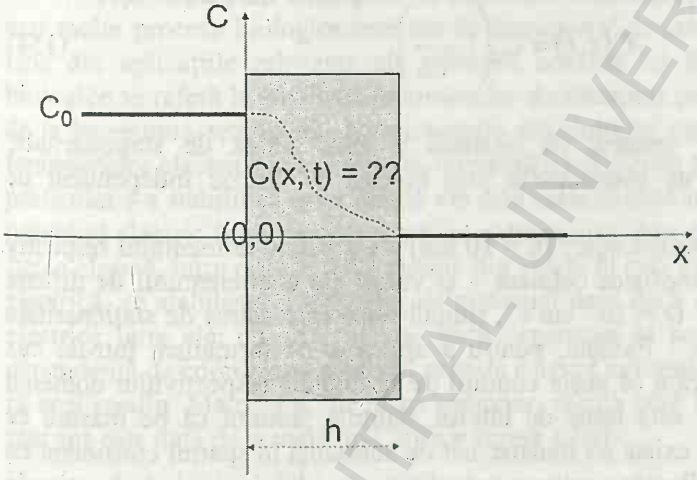


Figura 55 Reprezentarea schematizată a procesului de difuzie într-un domeniu spaţial limitat având grosimea 'h', mărginit de valori constante ale concentraţiei particulelor difuzante.

Şi în acest caz, întrebarea pusă este următoarea: care este profilul spaţio-temporal al modificărilor de concentraţie în interiorul domeniului de grosime 'h', în condiţiile în care valorile concentraţiei particulelor difuzante sunt menţinute constante la limitele respectivului domeniu? Matematic, problema de mai sus se reduce iarăşi la a determina soluţia ecuaţiei ce descrie procesul de difuzie mai-sus definit:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t}=D\frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \quad (152)$$

pentru:

$x\in(0,h)$

$t\in(0,\infty)$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Utilizând acelaşi protocol matematic de folosire a relaţiei de transformare Fourier integrală pentru funcţia C(x, t) în raport cu variabila 'x', soluţia finală obţinută este:

$$C(x,t)=C_0\left(1-\frac{x}{h}\right)-\frac{2C_0}{\pi}\sum_{k=1}^{\infty}\frac{\sin\left(\frac{k\pi x}{h}\right)}{k}e^{\left\{-Dt\left(\frac{k\pi}{h}\right)^2\right\}} \qquad (153)$$

Pentru timpi de observaţie mari ($t>\frac{h^2}{\pi^2 D}$), termenii din seria ce aparţine termenului din dreapta a expresiei de mai sus tind spre zero, astfel încât profilul de concentraţie este dat de expresia binecunoscută:

$$C(x,t)=C_0\left(1-\frac{x}{h}\right) \qquad (154)$$

În aceste condiţii, spunem că sistemul a atins starea de staţionaritate, caracterizată de un profil de concentraţie prin mediul de difuzie independent de coordonata temporală.

Pentru dimensiuni nanoscopice (h = 10 nm) ale grosimii domeniului respectiv – situaţii relevante pentru biofizica celulară – şi valori ale coeficientului de difuzie pentru particulele difuzante D = 10^{-5} cm^2s^{-1}, timpul după care starea de staţionaritate este atinsă devine ~ 10 ns ! Evident, pentru a aplica acest formalism într-un caz practic, trebuie să ne asigurăm că acele condiţii de la limitele respectivului domeniu sunt respectate. După cum este lesne de înţeles, datorită faptului că pe măsură ce procesul de difuzie are loc, există un transfer net de substanţă în spaţiul considerat ce se extinde de la - ∞ la + ∞. Pentru a asigura îndeplinirea condiţiei iniţiale la frontierele domeniului, trebuie să existe un mecanism prin care, într-un semi-spaţiu (h, ∞), particulele să fie continuu 'distruse' iar în celălalt semi-spaţiu (- ∞, 0) particulele să fie continuu 'create', păstrând astfel ne-modificate condiţiile iniţiale. În situaţia relevantă pentru biofizică, a difuziei printr-o membrană celulară, această condiţie este relativ bine îndeplinită; datorită fluxului extrem de mic de particule ce străbat nanoporii membranari şi a timpului extrem de scurt până când se obţine starea de staţionaritate printr-o biomembrană (~ ns), putem aproxima fără a greşi că particulele difuzante nu alterează vizibil concentraţiile la limitele domeniului discutat pe parcursul unei măsurători ce poate să dureze chiar zeci de minute. Oricum, pentru a păstra rigoarea ştiinţifică, în acest caz, apreciem că problema difuziei este studiată în condiţii de cvasistaţionaritate.

5 ECUAŢIA LUI NERNST. CIRCUITUL ELECTRIC ECHIVALENT AL UNEI MEMBRANE CU PROPRIETĂŢI DE SEMIPERMEABILITATE IONICĂ

Aşa după cum anticipam în capitolele anterioare, fundamentul fizic al celor mai multe procese biologice este dat de transportul de substanţă (ioni sau molecule). Una din aplicaţiile relevante ale aplicării ecuaţiei lui Smoluchowski în sistemele biologice se referă la studierea fenomenelor de transport ionic prin biomembrane. Încă de la începuturi, rezultatele experimentale ale biologiei celulare au indicat implicarea fenomenelor electrice în asamblarea coerentă a ţesuturilor şi organelor biologice, iar în particular s-a stabilit că orice celulă vie este caracterizată în prezenţa unei diferenţe de potenţial electric între mediile intra- şi extracelular. Aşa după cum este cunoscut din fizica clasică, între oricare două puncte din spaţiu în care există o distribuţie de sarcină electrică, se stabileşte o diferenţă de potenţial doar dacă există o separare de sarcini electrice între ele; cu alte cuvinte, dacă densitatea de sarcină electrică spaţială este dependentă de coordonata spaţială, aceasta asigură existenţa unei diferenţe de potenţial în acel mediu. Matematic, în cazul staţionar, relaţia care fundamentează afirmaţia de mai sus este dată de ecuaţia lui Laplace scrisă astfel:

$$\Delta V(x) = -\frac{\rho(x)}{\varepsilon} \tag{155}$$

unde densitatea de sarcină spaţială este dată de $\rho(x)$, iar permitivitatea absolută a mediului respectiv de ε.

Din punct de vedere fizic, existenţa unei diferenţe de potenţial electric celular poate fi pusă doar pe seama existenţei unei separări de sarcină electrică de o parte şi de alta a biomembranei. Tot fizica clasică ne spune că în cel mai simplu caz – şi care ar avea şanse să fie aplicabil lumii biologice – separarea de sarcină electrică se poate realiza dacă există fluxuri dirijate de sarcini electrice între mediile intra- şi extracelulare. Aşadar, biomembrana joacă cel puţin două roluri din acest punct de vedere: permite realizarea premiselor pentru existenţa unor fluxuri nete de sarcini electrice celulare, şi contribuie la întârzierea fenomenelor de reamestecare a sarcinilor electrice separate, care să determine apariţia stării de electroneutralitate celulară. Problema pe care o punem acum se referă la stabilirea unei relaţii matematice care să

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ne clarifice legătura cantitativă existentă între separarea de sarcină celulară şi diferenţa de potenţial electric celular. Fără a intra în detalii de structură moleculară, ne putem imagina următorul scenariu, aşa cum este figurat mai jos.

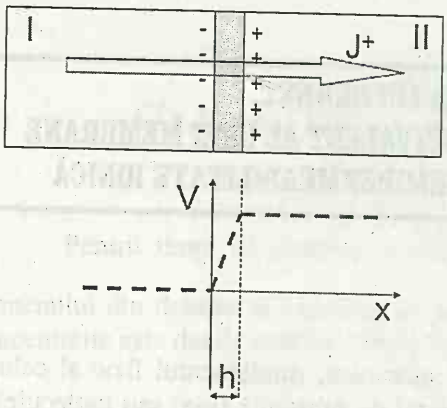


Figura 56 Modelarea simplificatoare a unei bariere de semi-permeabilitate ionică, cu grosimea 'h', ce separă două compartimente între care există un gradient de concentraţie al particulelor difuzante care determină iniţierea unui flux de cationi aşa după cum este indicat.

Într-o reprezentare simplificată, ne putem imagina o celulă ca fiind constituită din două compartimente (notate cu 'I' şi 'II'), separate de o barieră dielectrică ce permite însă transportul selectiv de sarcină electrică. Să ne imaginăm în continuare că la un moment iniţial ales, mediile apoase 'I' şi 'II' conţin o sare oarecare dizolvată (de exemplu, KCl), şi că există un gradient de concentraţie între cele două medii; astfel:

$$C_I^{KCl} \neq C_{II}^{KCl} \tag{156}$$

De asemenea, la momentul iniţial caracterizat de lipsa difuziei între cele două compartimente, densitatea de sarcină electrică în ambele medii va fi nulă – spunem că există starea de electroneutralitate în mediile 'I' şi 'II', adică în cele două medii, valoarea concentraţiei ionilor de potasiu este egală cu a ionilor de clor. Judecând întreaga problemă în termeni macroscopici, nu este nevoie să facem referiri la fluctuaţiile de număr de ioni de clor şi potasiu în orice punct din mediile considerate, care conduc la abateri instantanee de la condiţia de electroneutralitate. Este lesne de înţeles că în acest context, şi diferenţa de potenţial electric între oricare două puncte din mediile respective va fi nulă.

Dacă membrana ce separă cele două medii este imaginată ca având proprietatea de selectivitate ionică, şi că doar ionii de potasiu pot difuza datorită gradientului de concentraţie între mediile 'I' şi 'II', este lesne de înţeles că prin sistem se va stabili un transport dirijat de ioni de potasiu (J^+), în sensul egalizării concentraţiilor sale între cele două medii. Datorită faptului că spaţiul de separaţie dintre cele două medii are proprietate de selectivitate ionică, ionii de clor vor fi deci excluşi de la acest proces de difuzie sub acţiunea gradientului lor de concentraţie între mediile 'I' şi 'II'. Astfel, dacă ne imaginăm că un ion de potasiu ajunge prin difuzie din mediul 'I' în mediul 'II' şi îşi 'părăseşte' deci anionul 'pereche' în mediul 'I', între

cele două medii va apărea deja o separare de sarcini electrice: astfel, mediul 'II' va fi încărcat electric net pozitiv, iar în mediul 'I' va deveni încărcat electric net negativ datorită prezenţei unui exces de un ion de clor. Ecuaţia lui Laplace ne spune însă că în cursul derulării acestor fenomene – de separare de sarcină electrică datorită difuziei selective prin membrană – între cele două medii se va genera o diferenţă de potenţial electric, V(x). O întrebare adresată cititorului interesat ar putea fi : unde anume sunt dispuse excesele de sarcini negative din mediul 'I' şi pozitive din mediul 'II' ?

Astfel, protocolul de analiză teoretică a problemei expuse mai sus se rezumă la a rezolva ecuaţia lui Smoluchowski, ce se referă la exprimarea cantitativă a fluxului unor particule încărcate, a căror difuzie are loc sub acţiunea simultană a unui gradient de concentraţie şi a unui gradient de potenţial electric.

Matematic, pentru cazul de faţă, această ecuaţie capătă următoarea formă:

$$J^+(x,t) = -D^+ \frac{\partial C^+(x,t)}{\partial x} - z^+ e^- B^+ C^+(x,t) \frac{\partial V(x)}{\partial x} \qquad (157)$$

unde:

- J^+ este fluxul de ioni permeabili de potasiu prin membrană;
- D^+ este coeficientul de difuzie al acestor ioni;
- B^+ este mobilitatea mecanică a ionilor de potasiu;
- z^+ şi e^- sunt valenţa ionilor de potasiu şi, respectiv, valoarea sarcinii electrice elementare;
- $C^+(x, t)$ este profilul de concentraţie al ionilor de potasiu prin membrană;
- $V(x)$ este profilul potenţialul electric prin membrană.

Trebuie să facem aici precizarea că potenţialul electric variază cu distanţa doar prin membrană, iar în mediile 'I' şi 'II' el are valoare constantă. Motivaţia acestei afirmaţii, pornind de la premise simple de fizică, rămâne la latitudinea cititorului. De asemenea, considerăm că deşi diferite, concentraţiile ionilor de potasiu în mediile 'I' şi 'II' sunt constante cu distanţa, iar profilul de concentraţie se stabileşte doar în volumul membranei; asupra acestei simplificări vom reveni ulterior. Dacă notăm prin:

$$u^+ = z^+ e^- B^+ \qquad (158)$$

mobilitatea electrică a ionilor de potasiu, şi dacă utilizăm relaţia lui Einstein:

$$D^+ = kTB^+ \qquad (159)$$

ecuaţia lui Smoluchowski se rescrie astfel:

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR

$$J^+(x,t) = -u^+ \frac{kT}{z^+ e^-} \frac{\partial C^+(x,t)}{\partial x} - u^+ C^+(x,t) \frac{\partial V(x)}{\partial x} \quad (160)$$

Prin înmulțirea acestei ecuații cu $\frac{N_A}{N_A}$ (unde N_A este numărul lui Avogadro) și utilizând notațiile:

$$R = N_A k$$
$$F = N_A e^- \quad (161)$$

unde R este constanta generală a gazelor perfecte și F este constanta lui Faraday, obținem:

$$J^+(x,t) = -u^+ \frac{RT}{z^+ F} \frac{\partial C^+(x,t)}{\partial x} - u^+ C^+(x,t) \frac{\partial V(x)}{\partial x} \quad (162)$$

Într-o formulare matematică echivalentă, ecuația de mai sus devine:

$$J^+(x,t) = -u^+ C^+(x,t) \left\{ \frac{RT}{z^+ F} \frac{\partial [\ln C^+(x,t)]}{\partial x} + \frac{\partial V(x)}{\partial x} \right\} \quad (163)$$

Această ecuație răspunde parțial la întrebarea pusă mai sus, și ne oferă o exprimare cantitativă a fluxului unor particule încărcate a căror difuzie are loc sub acțiunea simultană a unui gradient de concentrație și a unui gradient de potențial electric. Pentru a fi foarte riguroși, facem mențiunea că în ecuațiile de mai sus potențialul electric variază și cu timpul; pe măsură ce separarea de sarcină electrică între cele două medii are loc, mediată fiind de difuzia ionilor de potasiu diferența de potențial electric va fi din ce în ce mai mare. Deoarece considerăm însă că din punct de vedere electrodinamic problema noastră poate fi tratată utilizând ecuațiile lui Maxwell pentru cazul staționar, forța electrică ce se exercită asupra ionilor de potasiu depinde doar de derivata în raport cu distanța a potențialului electric. Această ipoteză simplificatoare este fundamentată de viteza de variație mică a potențialului electric cu timpul și a valorilor mici ale acestuia; aceasta conduce la o valoare nesemnificativă a câmpului magnetic generat de câmpul electric variabil în timp, ce provine din existența potențialului electric variabil în timp. Deci, în expresiile de mai sus am utilizat simplificat 'V(x)' în loc de 'V(x, t)'. Evident, procesul de difuzie descris mai sus nu poate să aibă loc până când se egalizează concentrațiile ionilor de potasiu în cele două medii; aceasta ar fi valabil doar în cazul în care particulele difuzante ar fi neutre electric. În cazul nostru, putem înțelege ușor că forța electrică ce se exercită asupra ionilor difuzanți de potasiu din partea câmpului electric generat de separarea de

sarcină este orientată în aşa fel încât se opune tendinţei lor de difuzie. Va exista deci un caz particular, în care tendinţa ionilor de potasiu de a se mişca dirijat în virtutea gradientului de concentraţie va fi contrabalansată de tendinţa lor de a se mişca în sens opus, datorită forţelor de repulsie electrostatice pe care 'le simt' din partea mediului 'II'. Experimental, acest caz este vizibil prin stabilirea unui flux nul de ioni de potasiu prin membrană; din acest moment, lipsa difuziei ionilor de potasiu va implica lipsa continuării procesului de separare de sarcină între cele două medii şi deci valoarea diferenţei de potenţial stabilite va fi maximă, stabilindu-se astfel starea de echilibru în procesul de difuzie studiat.

Matematic, scenariul descris mai sus este exprimat de următoarea ecuaţie:

$$\frac{RT}{z^+F}\frac{\partial\left[\ln C^+(x,t)\right]}{\partial x}+\frac{\partial V(x)}{\partial x}=0 \tag{164}$$

Prin schimbare de variabilă de integrare, şi dacă notăm prin (C_I^+, C_{II}^+) valorile concentraţiei ionilor de potasiu în mediile 'I' şi 'II' atunci când starea de echilibru a fost atinsă, şi prin (V_I, V_{II}) valorile potenţialului electric în cele două medii, tot la echilibru, putem scrie:

$$\frac{RT}{z^+F}\int_{C_I^+}^{C_{II}^+}\partial\ln C^+(x,t)=-\int_{V_I}^{V_{II}}dV(x) \tag{165}$$

Efectuarea integralelor de mai sus conduce la deducerea expresiei ce dă diferenţa de potenţial care asigură starea de echilibru în procesul de difuzie, aşa cum a fost descris mai sus şi care se numeşte ecuaţia lui Nernst:

$$V_I-V_{II}=-\frac{RT}{z^+F}\ln\left(\frac{C_I^+}{C_{II}^+}\right)=V_{eq.}^+ \tag{166}$$

Deşi simplă în exprimare matematică, un cititor extrem de pedant ar putea ridica următoarea problemă: chiar dacă raţionamentul descris pentru determinarea relaţiei de mai sus este corect fizic, această relaţie este extrem de greu de utilizat în practică pentru că nu este extrem de accesibilă determinarea concentraţiilor finale ale ionilor difuzanţi de potasiu din cele două medii, după ce starea de echilibru a fost atinsă. Altfel spus, chiar dacă la momentul iniţial aveam, de exemplu, concentraţii de 3 M şi, respectiv, 1 M în mediile 'I' şi 'II, după ce starea de echilibru descrisă mai sus este stabilită, datorită procesului de difuzie – şi deci de transport de masă – valorile finale în cele două medii ale ionilor difuzanţi vor fi (3 M - δ) şi, respectiv, (3 M + δ). Valoarea factorului de corecţie 'δ' se referă cantitativ tocmai la modificările de

concentrație în cele două medii, induse de transportul dirijat de ionii de potasiu. Datorită faptului că fluxurile ionice în sistemele biologice sunt relativ mici la scara temporală la care se studiază aceste procese, putem aprecia că până când starea de echilibru descrisă mai sus este atinsă nu se produc modificări vizibile macroscopic de concentrații ionice în cele două medii; altfel spus, putem utiliza fără a greși valorile de concentrație inițiale pentru ionii de potasiu, pentru a face predicții teoretice asupra diferenței de potențial de echilibru dedusă mai sus.

Dacă vom considera că mișcarea dirijată a ionilor de potasiu are loc sub acțiunea unei diferențe inițiale de potențial electric ce este stabilită din exterior între mediile 'I' și 'II', și dacă valorile de concentrație sunt exprimate în unități molare, în termeni de densitate de curent electric prin membrană, ecuația lui Smoluchowski se poate scrie astfel:

$$I^+(x,t) = -u^+ F C^+(x,t)\left\{\frac{RT}{z^+F}\frac{\partial[\ln C^+(x,t)]}{\partial x} + \frac{\partial V(x)}{\partial x}\right\} \tag{167}$$

În expresia de mai sus, V(x) este profilul potențialului electric prin membrană ce este cauzat de prezența unei baterii externe.

Scrisă într-o altă formă, această ecuație devine:

$$\frac{I^+(x,t)}{u^+ F C^+(x,t)} = -\left\{\frac{RT}{z^+F}\frac{\partial[\ln C^+(x,t)]}{\partial x} + \frac{\partial V(x)}{\partial x}\right\} \tag{168}$$

Făcând ipoteza simplificatoare că acest proces este studiat la o scală de timp corespunzătoare stabilirii staționarității în procesul de difuzie studiat – vezi mai sus – din ecuația de continuitate scrisă mai jos:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial J(x,t)}{\partial x} \tag{169}$$

rezultă că valoarea fluxului de sarcină și, implicit, a densității de curent electric prin membrană este o mărime independentă de coordonata spațială 'x'. Astfel, ecuația lui Smoluchowski scrisă mai sus devine:

$$I^+ \int_0^h \frac{\partial x}{F z^+ u^+ C^+(x)} = \frac{RT}{z^+F}\ln\left(\frac{C_I^+}{C_{II}^+}\right) + V_I - V_{II} \tag{170}$$

Utilizând acum notația:

$$R^+ = \int_0^h \frac{\partial x}{F z^+ u^+ C^+(x)} \tag{171}$$

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ

ecuaţia lui Smoluchowski se scrie simplificat astfel:

$$I^{+} = \frac{\left(V - V_{eq.}{}^{+}\right)}{R^{+}} \tag{172}$$

unde:

$$V = V_I - V_{II}$$

$$V_{eq.}{}^{+} = -\frac{RT}{z^{+}F} \ln \frac{C_I^{+}}{C_{II}^{+}} \tag{173}$$

Relaţia dedusă mai sus (172) este foarte asemănătoare cu binecunoscuta lege a lui Ohm din fizica clasică, şi oferă o descriere cantitativă a densităţii de curent electric ce se stabileşte printr-o membrană selectivă ionic ce separă două medii, în care concentraţiile ionilor difuzanţi sunt date de (C_I^{+}, C_{II}^{+}), iar diferenţa de potenţial aplicată dintr-o baterie externă este dată de (V). Dacă nu există gradient de concentraţie între cele două medii, prezenţa bateriei externe facilitează stabilirea unui flux net de sarcini prin biomembrană, iar expresia de mai sus descrie relaţia de legătură între curentul electric stabilit şi diferenţa de potenţial aplicată – legea lui Ohm.

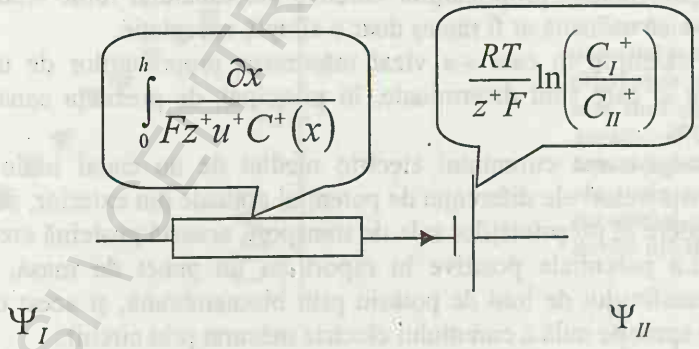


Figura 57 Reprezentarea echivalentă, cu elemente de circuit pasive, a unei biomembrane cu proprietăţi de selectivitate ionică.

Echivalent electric, un asemenea circuit – membrana ce separă cele două medii din cazul discutat mai sus, şi în condiţiile amintite – poate fi reprezentată ca mai sus (Fig. 57). Este demn de reţinut faptul că prin prisma relaţiei de mai sus, valoarea curentului electric stabilit printr-o membrană ce separă două medii în care concentraţia

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

speciei difuzante are valori diferite – creând astfel premisele existenței unui gradient de concentrație – depinde nu doar de diferența de potențial electric aplicată din exterior, dar și de raportul concentrațiilor ionilor difuzanți.

Din punct de vedere experimental, aplicarea teoriei expuse mai sus implică măsurarea curenților electrici mediați de sistemul biologic investigat.

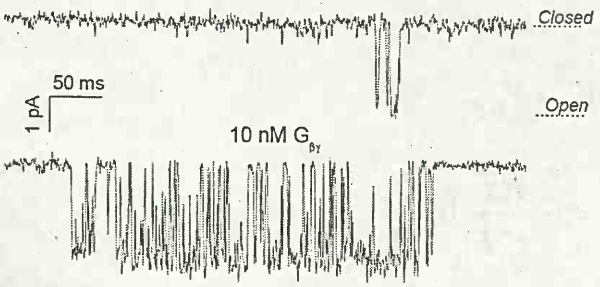


Figura 58 Înregistrare experientală a proceselor de transport ionic mediate de un canal de potasiu al cărui activitate cinetică este modulată de interacțiunea cu proteina G activată (subunitățile 'βγ').

În figura de mai sus (Fig. 58), este prezentat un astfel de exemplu ce sugerează puterea de investigare a tehnicii '*patch-clamp*'. Utilizând această tehnică pentru investigarea efectelor induse de o subunitate a proteinei G disociate în comportamentul fizic al unui canal ionic de potasiu de tip '*inward-rectifier*', se remarcă următoarele: interacțiunea dintre respectiva proteină și canalul ionic nu produce alterarea proprietăților de transport ale canalului ionic – amplitudinea curentului electric mediat de canalul ionic este statistic neschimbată – în schimb, proprietățile cinetice, date de frecvența tranzițiilor canalului ionic între stările 'închis' ('*closed*') și 'deschis' ('*open*') sunt cu mult alterate. În absența utilizării acestei tehnici care să permită vizualizarea în timp real a activității unui singur canal ionic, acest efect specific de alterare doar a proprietăților cinetice ale canalului ionic studiat de către subunitatea proteică utilizată ar fi rămas doar o simplă speculație.

Un alt exemplu în care s-a vizat măsurarea proprietăților de transport ale biomembranelor și care sunt determinate, în principal, de prezența canalelor ionice este arătat mai jos.

Prin înregistrarea curentului electric mediat de un canal ionic de potasiu specific, la diferite valori ale diferenței de potențial aplicate din exterior, se constată că din punct de vedere al proprietăților sale de transport, această proteină are un caracter liniar limitat. La potențiale pozitive în raport cu un punct de masă, se remarcă cvasiabsența transferului de ioni de potasiu prin biomembrană, și acest caracter este dat de valoarea aproape nulă a curentului electric măsurat prin circuit.

BCU IAȘI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

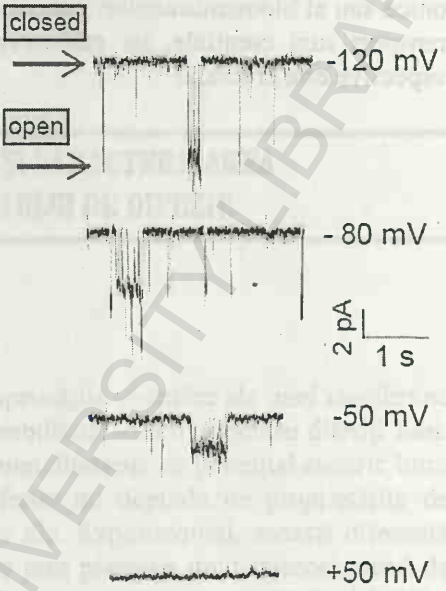


Figura 59 Date experimentale ce reflectă modificările de curent electric mediate de un canal de potasiu în urma aplicării unor diferenţe de potenţial pozitive şi negative, şi care pun în evidenţă comportamentul de tip '*inward rectifier*' al acestui transportor ionic (vezi text).

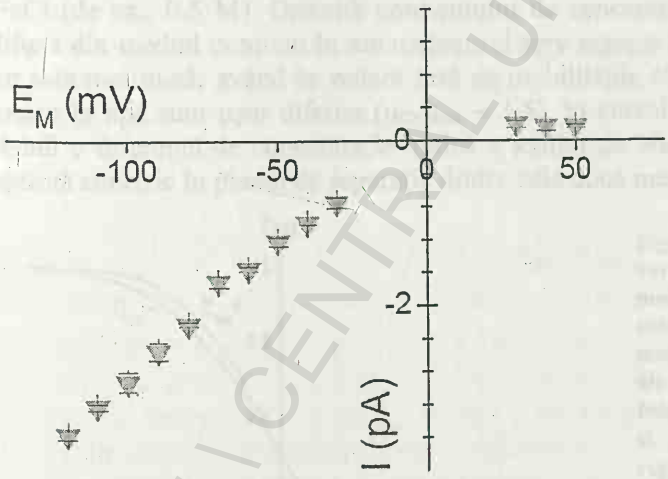


Figura 60 Diagrama completă curent-tensiune a unui canal de potasiu de tip '*inward rectifier*'; spre deosebire de aplicarea unor diferenţe de potenţial pozitive, atunci când diferenţele de potenţial aplicate sunt situate în domeniul negativ, se constată activarea fenomenului de transport ionic, prin aceea că valoarea curentului electric înregistrat devine diferit de zero.

Atunci când diferenţa de potenţial de măsură este situată în domeniul negativ, se constată activarea fenomenului de transport ionic, prin aceea că valoarea curentului electric înregistrat devine diferit de zero. Diagrama curent-tensiune pentru aceste înregistrări de curent electric mediat de respectiva proteină fac posibilă vizualizarea eficientă a caracterului de 'diodă moleculară' a acestui canal ionic; în regiunile de potenţiale electrice negative şi pozitive, comportamentul canalului ionic studiat este cvasi-ohmic, iar rezistenţa sa electrică este extrem de diferită în cele două situaţii.

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rezultatele experimentale exemplificate mai sus subliniază faptul că, pentru a cunoaşte detalii despre proprietăţile de transport şi comportamentul fizic al canalelor ionice sau al biomembranelor, cunoaşterea ecuaţiilor ce guvernează aceste procese de transport sunt esenţiale, iar realizarea experimentelor care să completeze ecuaţiile respective este crucială.

BCU IASI \ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6 DESCRIEREA ŞI CARACTERIZAREA POTENŢIALULUI DE DIFUZIE

În paragraful precedent, am analizat proprietăţile electrice ale unei membrane biologice ce rezultă din caracterul său de permeabilitate selectivă pentru diferiţi ioni. Există însă situaţii practice, în care dezvoltarea unei diferenţe de potenţial electric între două compartimente cu concentraţii ionice diferite nu depinde de proprietăţile de semipermeabilitate ale regiunii de interfaţă între ele. Experimental, această diferenţă de potenţial se pune în evidenţă cel mai simplu prin plasarea unui microelectrod de sticlă, umplut cu soluţie de NaCl (3M) într-un compartiment cu concentraţie diferită a NaCl (de ex., 0.5 M). Datorită gradientului de concentraţie, ionii de Na^+ şi Cl^- vor difuza din mediul conţinut în microelectrod spre compartimentul în care concentraţia lor este mai mică; având în vedere însă că mobilităţile electrice ale celor două specii ionice în apă sunt uşor diferite ($u_{Cl}/u_{Na} \sim 1.5$), în cursul procesului de difuzie se va stabili o diferenţă de concentraţie ionică a ionilor de Na^+ şi Cl^- într-o zonă limitată, aşezată simetric în planul de separaţie dintre cele două medii (Fig. 61).

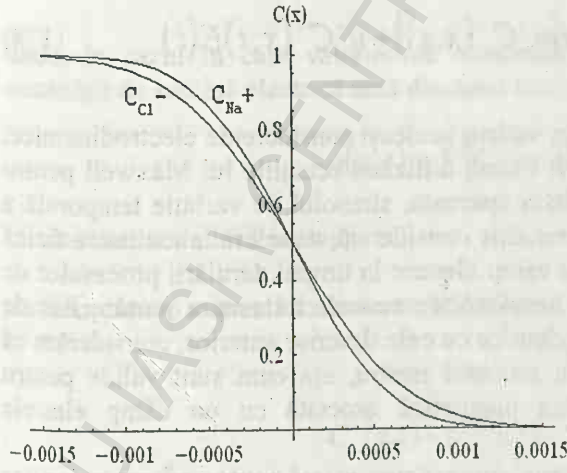


Figura 61 Profilul simulat de variaţie spaţială a concentraţiei normalizate a ionilor de sodiu şi clor ce sunt lăsaţi să difuzeze între două medii ce conţin concentraţii diferite ale acestor ioni (vezi ecuaţia 149). Iniţial, concentraţia ionilor de sodiu şi clor avea valoare maximă în regiunea $x \in (-\infty, 0)$, iar în regiunea $x \in (0, \infty)$, concentraţia lor era nulă. Pentru timpul intermediar la care s-au trasat aceste diagrame ($t = 0.001$ s), se consideră că difuzia ionilor respectivi are loc exclusiv sub influenţa gradientului de concentraţie.

În situaţia descrisă de noi, între cele două medii, se va stabili un gradient de densitate spaţială de sarcină electrică netă, aşa cum este arătat mai jos:

BCU IAŞI / CENTRUL DE RESURSE / LIBRARY

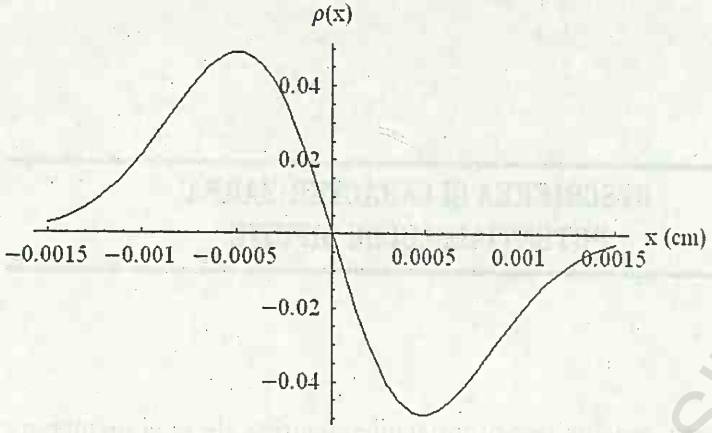


Figura 62 Profilul de variație spațială a densității nete de sarcină electrică ce se stabilește la un moment dat – identic cu cel pentru care s-au trasat diagramele din figura precedentă – de o parte și de alta a suprafeței de separație ce separă două medii ce conțin concentrații diferite ale acestor ioni. Contextul fizic al problemei este identic cu cel discutat pentru figura precedentă.

Remarcăm că există un domeniu spațial limitat (zona tranziționlă), așezat simetric față de planul de separație dintre cele două medii, în care densitatea de sarcină electrică netă – negativă și pozitivă – este diferită de zero (Fig. 62). În volumul celor două medii însă, densitatea de sarcină electrică devine nulă și condiția de electroneutralitate predomină. Urmând un raționament similar ca la subcapitolul precedent, ne punem problema de a găsi o valoare analitică pentru valoarea diferenței de potențial electric ce se stabilește astfel între cele două medii. Păstrând aceleași notații, ecuația lui Smoluchowski pentru difuzia ionilor de sodiu în zona tranzițională sub acțiunea simultană a unui gradient de concentrație și a unei forțe electrice constante în spațiu (E(t)) derivată dintr-un gradient de potențial electric, este:

$$J^{+}(x,t) = -\frac{RT}{F} grad\left[u^{+}C^{+}(x,t)\right] + u^{+}C^{+}(x,t)E(t) \qquad (174)$$

În expresia de mai sus, avem în vedere aceleași considerente electrodinamice, ce permit problemei noastre să poată fi tratată utilizând ecuațiile lui Maxwell pentru cazul staționar. Pentru a elimina confuzia aparentă, simbolul de variație temporală a câmpului electric ce apare în zona de tranziție considerată, se referă la realitatea fizică ce exprimă variația temporală a acestui câmp electric în timpul derulării proceselor de difuzie; însă, din punct de vedere al forțelor care se exercită asupra purtătorilor de sarcină și prin prisma unor argumente identice cu cele descrise anterior, considerăm că ecuațiile lui Maxwell se aplică pentru sistemul nostru, așa cum sunt valide pentru cazuri staționare, în care componenta magnetică asociată cu un câmp electric nevariabil în timp este nulă.

Ecuația de continuitate ce descrie conservarea masei pentru mișcarea ionilor de sodiu în zona tranzițională este:

$$\frac{\partial C^{+}(x,t)}{\partial t} = -div\, J^{+}(x,t) \tag{175}$$

Prin înlocuirea acestei expresii în ecuaţia lui Smoluchowski, obţinem:

$$\frac{\partial C^{+}(x,t)}{\partial t} = \frac{RT}{F} div(grad U) - div\left[U\, E(t)\right] \tag{176}$$

unde $U = u^{+}C^{+}$. (a nu se confunda acest 'U' cu termenul ce desemnează energia potenţială !!)

În mod similar, pentru descrierea mişcării ionilor de clor putem scrie relaţia analitică:

$$\frac{\partial C^{-}(x,t)}{\partial t} = \frac{RT}{F} div(grad W) + div\left[W\, E(t)\right] \tag{177}$$

unde $W = u^{-}C^{-}$.

În continuare, pentru a deduce expresia valorii câmpului electric ce se dezvoltă în zona tranziţională de difuzie, utilizăm ecuaţia lui Poisson:

$$div\, E(t) = \frac{\rho(x,t)}{\varepsilon} \tag{178}$$

unde, în cazul în care valorile de concentraţie sunt exprimate în moli, expresia densităţii de sarcină electrică netă din zona de tranziţie este dată de:

$$\rho(x,t) = F\left[C^{+}(x,t) - C^{-}(x,t)\right] \tag{179}$$

(F este constanta lui Faraday)

Astfel, printr-o aritmetică elementară, deducem că:

$$C^{+}(x,t) - C^{-}(x,t) = \frac{div\left[\varepsilon\, E(t)\right]}{F} \tag{180}$$

Prin derivarea relaţiei de mai sus în raport cu timpul, obţinem:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\frac{\partial\left[C^{+}(x,t)-C^{-}(x,t)\right]}{\partial t}=\frac{\frac{\partial\{div[\varepsilon E(t)]\}}{\partial t}}{F}=\frac{div\left\{\frac{\partial[\varepsilon E(t)]}{\partial t}\right\}}{F} \tag{181}$$

Din relațiile deduse mai sus pentru ecuația lui Smoluchowski combinate cu ecuația lui Poisson ce descriu transportul sarcinilor ionice pozitive și, respectiv, negative, obținem:

$$div\left\{\frac{\partial[\varepsilon E(t)]}{\partial t}\right\}=RTdiv[grad(U-W)]-div\left[(U+W)F\,E(t)\right] \tag{182}$$

sau echivalent:

$$div\left\{\frac{\partial\left[\varepsilon\,E(t)\right]}{\partial t}+F(U+W)E(t)-RTgrad(U-W)\right\}=0 \tag{183}$$

Deoarece operatorul 'divergență' se referă la operațiunea de derivare spațială, pentru ca egalitatea de mai sus să poată fi satisfăcută trebuie ca argumentul operatorului respectiv să fie o funcție constantă în spațiu sau dependentă de o altă coordonată (în cazul nostru, coordonata temporală); astfel, putem scrie:

$$\frac{\partial\left[\varepsilon\,E(t)\right]}{\partial t}+F(U+W)E(t)-RTgrad(U-W)=A(t) \tag{184}$$

Știind însă că la începutul procesului de difuzie, câmpul electric în zona de tranziție este nul, iar gradienții de concentrație ionică în aceeași regiune sunt nuli – difuzia neîncepând încă – putem egala A(t) cu zero.

O altă presupunere necesară pentru rezolvarea ecuației de mai sus este că în timpul în care câmpul electric se dezvoltă în zona de tranziție, variația concentrațiilor în cele două compartimente este nulă. Argumentele utilizate sunt similare cu cele discutate la subcapitolul precedent (fluxuri mici de substanță ce nu modifică apreciabil distribuțiile nete de concentrație în cele două medii). Matematic, putem scrie această condiție astfel:

$$\frac{\partial[grad(U-W)]}{\partial t}=0 \tag{185}$$

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În aceste condiţii, soluţia ecuaţiei ce descrie variaţia temporală a câmpului electric dezvoltat între cele două medii între care are loc difuzia ionilor de sodiu şi clor (185) se scrie astfel:

$$E(t) = \frac{RT}{F}\frac{grad(U-W)}{U+W}\left[1-\exp\left\{-\frac{F(U+W)t}{\varepsilon}\right\}\right] \qquad (186)$$

După cum se poate observa, câmpul electric dezvoltat între cele două medii creşte spre o valoare maximă, dată de:

$$E_{max} = \frac{RT}{F}\frac{grad(U-W)}{U+W} \qquad (187)$$

Dacă cele două specii ionice difuzante au coeficienţi de difuzie diferiţi, de ce câmpul electric dezvoltat în sistemul nostru nu poate creşte oricât? Răspunsul este simplu: vectorul acestui câmp electric este orientat în aşa fel, încât el se opune difuziei ionilor mai mobili (în cazul nostru, al ionilor de clor) şi favorizează difuzia ionilor mai puţin mobili (ionii de sodiu). Astfel, după un anumit interval de timp când valoarea acestui câmp electric atinge o valoare limită, se ajunge la starea de staţionaritate în care numărul mediu de sarcini pozitive ce se mişcă în sensul indicat de gradientul de concentraţie şi sub acţiunea câmpului electric existent devine egal cu numărul mediu de sarcini negative, ce au acelaşi destin fizic. În această situaţie, curentul electric total dezvoltat în sistem devine nul şi, în consecinţă, nu va mai exista separare de sarcină netă între cele două medii; deci, valoarea câmpului electric ce dictează acest scenariu fizic este tocmai cel dat de expresia de mai sus (E_{max}). Este însă evident că în timp, procesele de difuzie ale celor două specii ionice continuând să existe (sistemul nostru este în stare de staţionaritate, şi nu de echilibru), ele vor conduce la egalizarea concentraţiilor speciilor ionice între cele două medii. Astfel, valoarea câmpului electric maxim de care discutam mai sus descreşte în timp încet, dar sigur, spre valoare nulă. Fără a intra în detalii numerice, nu trebuie uitat că în cazul sistemelor biofizice macroscopice obişnuite, timpii de încărcare (după care câmpul electric tranziţional atinge valoare maximă) şi cel de redistribuţie (după care câmpul electric tranziţional atinge valoare nulă) diferă cu multe ordine de mărime, astfel încât cele două procese (de încărcare şi redistribuţie) pot fi considerate ca fiind bine separate în timp. Dacă pentru scopul de a determina valoarea maximă a diferenţei de potenţial electric local din regiunea de tranziţie se consideră că în zona tranziţională, condiţia de electroneutralitate este aproximativ satisfăcută (vezi mai sus), se pot înlocui în aceste condiţii valorile mărimilor U şi W în expresia de mai sus ($U(x) = u^+C^+(x)$, $W(x) = u^-C^-(x)$ şi $C^+(x) = C^-(x) = C(x)$ pentru zona tranziţională).

În aceste condiţii, rezultă că valoarea maximă a diferenţei de potenţial electric între cele două compartimente este dată de soluţia ecuaţiei:

$$-\frac{dV(x)}{dx}=\frac{RT}{F}\frac{u^+-u^-}{u^++u^-}\frac{1}{C(x)}\frac{dC(x)}{dx} \tag{188}$$

Multiplicând această ecuație cu dx, și integrând-o prin zona tranzițională ce se consideră a avea lărgimea 'h', unde la x = 0, V(x) = V(0) = $V^{(I)}$ și C(x) = C(0) = $C^{(I)}$ iar la x = h V(x) = V(h) = $V^{(II)}$ și C(x) = C(h) = $C^{(II)}$, rezultă:

$$V^{(I)}-V^{(II)}=\Delta V_{difuzie}=\frac{RT}{F}\frac{u^+-u^-}{u^++u^-}\ln\left(\frac{C^{(II)}}{C^{(I)}}\right) \tag{189}$$

Trebuie reținut că expresia potențialului de difuzie exprimat mai sus poate căpăta valori apreciabile (de ordinul zecilor de milivolți) în majoritatea situațiilor experimentale în care se utilizează diferiți electrozi pentru detectarea și măsurarea biopotențialelor celulare sau a curenților electrici transmembranari. Prezentăm mai jos un exemplu experimental în care, datorită contextului dorit de experimentator, în compartimentele (I) și (II) ale sistemului de măsură există concentrații diferite ale unei soluții ionice: de exemplu, în primul compartiment avem 1 M NaCl, iar în celălalt compartiment, concentrația soluției de NaCl este de 1 mM. Dacă se dorește a se determina diferența de potențial între cele două compartimente ce caracterizează alt fenomen important – cum ar fi selectivitatea ionică între mai multe specii ionice permeante, caz în care este de dorit măsurarea tot a unei diferențe de potențial definită de relația Goldman – Hodgkin – Katz – (vezi mai jos), în mod evident, potențialul de difuzie ce apare între cele două compartimente se va suprapune peste diferența de potențial 'utilă'. Evident, pentru a elimina potențialul de difuzie, în cel mai simplu caz ar trebui să folosim în cele două compartimente soluții ionice cu aceeași concentrație; în acest caz însă, nu avem condițiile necesare pentru determinarea potențialului Goldman – Hodgkin – Katz. Soluția experimentală utilizată este pe cât de simplă, pe atât de ingenioasă și ea presupune utilizarea unor electrozi de măsură speciali, în care firul metalic de Ag/AgCl ce constituie elementul conductor esențial al electrodului este imersat într-o soluție saturată de agaroză ce conține 3M NaCl (Fig. 63). Rolul gelului de agaroză este de a reduce considerabil egalizarea concentrațiilor de NaCl între interiorul electrozilor și soluțiile ionice din cele două compartimente.

BCU IASI / CAROL I UNIVERSITY LIBRARY

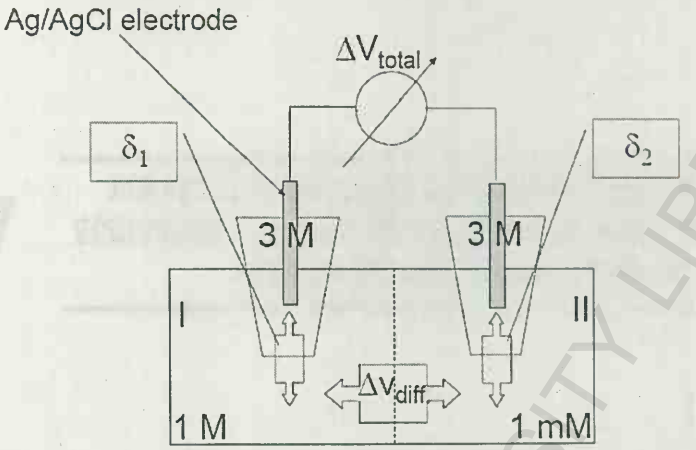


Figura 63 Reprezentarea schematizată a unui ansamblu experimental specific în care, prin utilizarea unor soluţii de imersare (agaroză + 3 M NaCl) pentru electrozii metalici utilizaţi pentru măsurători electrice între compartimentele 'I' şi 'II', se urmăreşte anularea diferenţei de potenţial de difuzie între cele două compartimente.

În aceste condiţii, potenţialul de difuzie total în circuit este dat de suma a trei termeni:

$$\Delta V_{total} = \delta_1 + V_{diff.} + \delta_2 \qquad (190)$$

unde δ_1 şi δ_2 sunt potenţialele de difuzie între interiorul electrozilor şi mediul din cuvele (I) şi, respectiv, (II), iar $V_{diff.}$ este potenţialul de difuzie între mediile (I) şi (II).

Ţinând cont de valorile numerice ale concentraţiilor speciilor ionice respective în aceste medii, potenţialul de difuzie total în circuit este dat de:

$$\Delta V_{total} = V_{II} - V_I = ct \ln\left(\frac{3M}{0.001M}\right) + ct \ln\left(\frac{0.001M}{1M}\right) + ct \ln\left(\frac{1M}{3M}\right) = 0 \qquad (191)$$

unde prin 'ct' am notat coeficientul constant:

$$ct = \frac{RT}{T}\frac{u^+ - u^-}{u^+ + u^-} \qquad (192)$$

Aşadar, prin această metodă experimentală elegantă de utilizare a unor aşa-numite punţi de agaroză, anulăm valoarea totală a potenţialului de difuzie din sistemul nostru.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7 ECUAŢIA LUI GOLDMAN. REPREZENTAREA ELECTRICĂ ECHIVALENTĂ A UNEI MEMBRANE BIOLOGICE PERMEABILE PENTRU MAI MULTE SPECII IONICE

Cu toată simplitatea sa excesivă, dar totuşi productivă, a modelului din care am dedus ecuaţia lui Nernst, există numeroase cazuri în biofizica celulară în care acest formalism trebuie modificat pentru o bună descriere fizică a realităţii. Un asemenea caz se referă la membrane biologice reale care, în ciuda tuturor simplificărilor pe care le atribuim lor, în vederea descrierii proceselor de transport mediate, păstrează o caracteristică distinctă: sunt, în general, semipermeabile pentru mai multe specii ionice (anioni şi/sau cationi). În literatură, formalismul care ajută la înţelegerea fenomenelor de transport în aceste situaţii poartă numele de teoria lui Goldman. Pentru a facilita înţelegerea formalismului lui Goldman, vom reduce analiza ecuaţiilor de difuzie ionică la o membrană biologică cu proprietăţi de semipermeabilitate, aşa cum este reprezentată schematic mai jos:

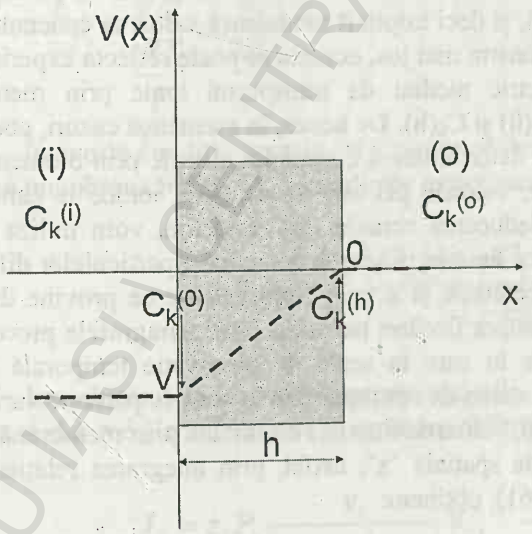


Figura 64 Reprezentarea schematizată a variaţiei concentraţiei speciei ionice k şi a potenţialului electric V(x) printr-o biomembrană, în cadrul formalismului lui Goldman.

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

În schița de mai sus, semnificația mărimilor este următoarea:

- V(x) este valoarea potențialului electric prin membrană, și care se presupune că are o variație liniară în acest formalism;
- V este valoarea potențialului electric pe partea internă a membranei $V(0)=V^{(i)}=V$; pe partea externă se alege $V(h)=V^{(0)}=0$ (de exemplu, partea externă a membranei este conectată la masa instalației de măsură);
- h este grosimea membranei biologice;
- $C_k^{(i)}$, respectiv, $C_k^{(o)}$ sunt concentrațiile speciei ionice (k) în domeniul intern și extern al membranei;
- $C_k(0)$ și $C_k(h)$ sunt valorile concentrației speciei ionice (k) în imediata vecinătate a suprafețelor de separație a membranei de mediile externe, respectiv interne. Se presupune că datorită interacțiunilor specifice ion-membrană, aceste concentrații nu sunt riguros identice cu $C_k^{(i)}$, respectiv, $C_k^{(o)}$, ci sunt date de relațiile: $C_k(0) = \alpha_k C_k^{(i)}$ și $C_k(h) = \alpha_k C_k^{(o)}$ (α_k se numește coeficient de distribuție între faza apoasă și lipidică a speciei ionice k).

De asemenea, facem presupunerea simplificatoare că, în cel mai simplu caz, existența unei densități de sarcină electrică fixă pe suprafața membranei dată de prezența unor lipide membranare încărcate electric (de exemplu, fosfatidilserina – încărcată electric negativ la pH neutru) poate constitui unul din factorii ce contribuie la diferența între valoarea concentrației ionilor difuzanți în volumul soluției din cele două medii și chiar la 'granița' biomembranei prin care difuzează. Trebuie să menționăm că, în asemenea situații, valori diferite ale tăriei ionice a soluției ce constituie cele două medii sau ale pH-ului, pot ecrana diferențiat densitatea de sarcină electrică fixă de pe suprafața membranei (teoria Debye – Hückel), și deci implicit modulează valoarea concentrațiilor $C_k(0)$ și $C_k(h)$. După cum vom demonstra mai jos, aceasta se poate reflecta experimental într-o modulare a curentului electric mediat de transportul ionic prin membrana respectivă ce depinde explicit de $C_k(0)$ și $C_k(h)$. De aceea, în asemenea cazuri, condițiile externe ce definesc experimente de determinare a curentului electric prin biomembrane trebuie să includă, în mod necesar, valorile pH-ului și ale tăriei ionice la care acele experimente au avut loc. Pentru deducerea ecuației lui Goldman, vom utiliza forma echivalentă a legii a II-a a lui Fick ce descrie mișcarea colectivă a particulelor difuzante sub acțiunea unui gradient de concentrație și a unei forțe externe ce provine dintr-un potențial V(x), și care se exercită asupra fiecărei particule (vezi paragrafele precedente, ecuațiile 126 și 130). În condițiile în care la scala de observație temporală pentru procesul studiat se consideră atinsă starea de staționaritate în ceea ce privește variația în timp a concentrației ionilor difuzanți, valoarea fluxului de sarcină prin membrană este o mărime independentă de coordonata spațială 'x'; astfel, prin integrarea relației (130) între (0) și (h) și folosind relațiile (161), obținem:

$$J_k = D_k \frac{C_k(0)\exp\left\{z_k v^{(i)}\right\} - C_k(h)\exp\left\{z_k v^{(o)}\right\}}{\int_0^h \exp\{z_k v(x)\}dx} \tag{193}$$

unde indicele (k) se referă la specia ionică corespunzătoare k, iar semnificaţia celorlalte mărimi este aşa cum a fost descrisă mai sus.

Trebuie remarcat că în această ecuaţie folosim potenţialul normalizat v(x), unde:

$$v(x) = \frac{V(x)}{\frac{RT}{F}} \tag{194}$$

Făcând schimbarea de variabilă pentru integrala de la numitorul expresiei 193, rezultă:

$$\int_0^h \exp\{z_k v(x)\}dx = \int_{v_i}^0 \exp\{z_k v(x)\}\left(\frac{dx}{dv}\right)dv = -\frac{h}{z_k v_i}\left(1-\exp\{z_k v_i\}\right) \tag{195}$$

unde v_i este valoarea normalizată a potenţialului electric pe partea internă a membranei $v_i = \frac{V^{(i)}}{\frac{RT}{F}} = \frac{V}{\frac{RT}{F}}$.

În aceste condiţii, ecuaţia lui Kramer ce descrie cantitativ fluxul speciei ionice (k) prin membrana biologică în condiţiile experimentale date, devine:

$$J_k = z_k v_i \left(\frac{D_k}{h}\right)\frac{C_k(h) - C_k(0)\exp\{z_k v_i\}}{1-\exp\{z_k v_i\}} \tag{196}$$

Introducând în această expresie valorile concentraţiilor ionice în regiunile interne şi externe ale membranei (a se vedea definiţiile de mai sus), obţinem:

$$J_k = z_k P_k \frac{v_i}{1-\exp\{z_k v_i\}}\left\{C_k^{(o)} - C_k^{(i)}\exp\{z_k v_i\}\right\} \tag{197}$$

unde P_k se numeşte coeficient de permeabilitate al speciei ionice (k) şi este definit astfel:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$P_k = \frac{\alpha_k D_k}{h} \tag{198}$$

În condițiile în care diferența de potențial aplicată din exterior este nulă ($v_i = 0$):

$$\begin{aligned} & v_i \to 0 \\ & \lim_{v_i \to 0}\left(\frac{z_k v_i}{1 - e^{z_k v_i}}\right) \to -1 \\ & \lim_{v_i \to 0}\left(J_k\right) \to P_K\left(C_k^{(i)} - C_k^{(o)}\right) \end{aligned} \tag{199}$$

ecuația de mai sus (197) capătă forma legii I a lui Fick.

În condițiile în care gradientul de concentrație este nul, ecuația (297) devine:

$$\begin{aligned} & C_k^{(i)} = C_k^{(o)} = C, \\ & J_k = z_k P_k C v_i \end{aligned} \tag{200}$$

Astfel, prin relația de transformare de la flux de particule încărcate la densitate de curent electric, ecuația de mai sus redefineşte binecunoscuta lege a lui Ohm care oferă relația de dependență între curentul electric printr-un conductor şi diferența de potențial aplicată la capetele acelui conductor. Trebuie reținut deci că spre deosebire de conductorii metalici uzuali, în care relația de dependență între curentul electric stabilit prin acel conductor şi diferența de potențial aplicată din exterior la capetele sale este liniară, în cazul conducției ionice printr-o membrană ce separă două compartimente cu concentrații diferite ale speciei ionice respective, aveam de-a face cu un aşa-numit fenomen de rectificare electrică. Astfel, dacă presupunem valori arbitrare pentru P_k şi z_k ($P_k = z_k = 1$) şi că $C_k^{(o)} = 10C_k^{(i)}$, reprezentarea grafică a relației scrise ce dă dependența între J_k şi v_i va arăta ca mai jos (Fig. 65):

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

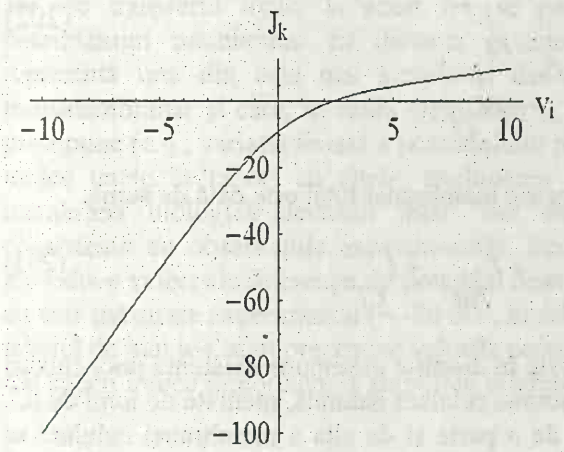


Figura 65 Forma simulată a diagramei de transport ce descrie fenomenul de conducţie ionică printr-o membrană ce separă două compartimente ce conţin concentraţii diferite ale speciei ionice respective, şi care evidenţiază fenomenul de rectificare electrică al respectivului sistem; astfel, la valori mai ales negative ale diferenţei de potenţial aplicate (v_i), fluxul purtătorilor de sarcină electrică (J_k) ce este proporţional cu valoarea densităţii de curent electric prin sistemul studiat, este mai mare decât în cazul în care semnul diferenţelor de potenţial aplicate se inversează.

Aşadar, se observă că pe lângă faptul că relaţia de dependenţă respectivă nu mai este liniară, valoarea fluxului de purtători de sarcină ce difuzează prin membrană va depinde în mărime absolută nu doar de valoarea diferenţei de potenţial aplicate din exterior, dar şi de semnul acesteia. Presupunând un caz particular, în care membrana biologică este permeabilă în principal pentru ionii de K^+ ($z_{K^+} = 1$), Na^+ ($z_{Na^+} = 1$) şi Cl^- ($z_{Cl^-} = -1$) – situaţia cel mai des întâlnită în cazul celulelor excitabile – şi utilizând ecuaţia 197, putem scrie următorul set de ecuaţii pentru fluxurile acestor specii ionice prin membrană:

$$J_{K^+} = P_{K^+} v_i \frac{C_{K^+}^{(o)} - C_{K^+}^{(i)} e^{v_i}}{1 - e^{v_i}}$$

$$J_{Na^+} = P_{Na^+} v_i \frac{C_{Na^+}^{(o)} - C_{Na^+}^{(i)} e^{v_i}}{1 - e^{v_i}} \qquad (201)$$

$$J_{Cl^-} = -P_{Cl^-} v_i \frac{C_{Cl^-}^{(i)} - C_{Cl^-}^{(o)} e^{v_i}}{1 - e^{v_i}}$$

Dacă valorile concentraţiilor din ecuaţiile de mai sus sunt exprimate în valori molare, prin definiţie, acestor fluxuri ionice le corespund următoarele densităţi de curenţi ionici membranari:

BCU ASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\begin{aligned} I_{K^+} &= FJ_{K^+} \\ I_{Na^+} &= FJ_{Na^+} \\ I_{Cl^-} &= -FJ_{Cl^-} \end{aligned} \tag{202}$$

Aşadar, densitatea de curent electric membranar total este dată de suma:

$$I_{total} = I_{K^+} + I_{Na^+} + I_{Cl^-} \tag{203}$$

Având în vedere că scenariul fizic în discuţie presupune existenţa unor fluxuri individuale de curent electric prin membrana celulară naturală, mediate de ionii de K^+, Na^+ şi Cl^-, distribuţia de sarcină netă de o parte şi de alta a membranei celulare se modifică în mod continuu. Ţinând cont de relaţia lui Laplace scrisă anterior, odată cu modificările de distribuţie de sarcina netă, se va modifica şi valoarea diferenţei de potenţial transmembranar. Un aspect deosebit de util al folosirii relaţiei de mai sus se referă la observaţia experimentală a unei stări particulare, în care diferenţa de potenţial transmembranar are o asemenea valoare, încât densitatea de curent electric total transmembranar este nul ($I_{total} = 0$); în acest caz, spunem că sistemul a atins starea de staţionaritate. Această stare este, de exemplu, caracteristică celulelor vii în starea de 'repaos'. Utilizând formulele deduse mai sus şi punând condiţia $I_{total} = 0$, rezultă că valoarea diferenţei de potenţial de staţionaritate este dată de:

$$V_m = v_m \frac{RT}{F} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+} C_{K^+}^{(o)} + P_{Na^+} C_{Na^+}^{(o)} + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^{(i)}}{P_{K^+} C_{K^+}^{(i)} + P_{Na^+} C_{Na^+}^{(i)} + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^{(o)}} \tag{204}$$

unde v_m este valoarea normalizată a potenţialului electric pentru care $I_{total} = 0$.

Expresia de mai sus (204) a fost dedusă în 1949 de Hodgkin şi Katz şi este cunoscută astăzi sub denumirea de ecuaţia lui Goldman – Hodgkin – Katz, iar una din presupunerile esenţiale făcute pentru deducerea sa a fost cea privitoare la liniaritatea variaţiei potenţialului prin membrana celulară. Din punct de vedere fizic, această presupunere simplificatoare impune ca valoarea câmpului electric prin membrană să fie constantă, şi deci densitatea netă de sarcină electrică prin aceasta să fie nulă. Din nefericire, această presupunere nu este aproape niciodată fundamentată experimental; aşa cum arătam într-un capitol anterior, în structura terţiară a celor mai multe porine sau a canalelor ionice există aminoacizi care la pH-ul soluţiei fiziologice sunt încărcaţi electric net şi sunt orientaţi cu grupările funcţionale spre interiorul porului permeant. Aceasta conduce la existenţa unor densităţi de sarcină electrică netă diferită de zero, iar teorii mai elaborate care să descrie mai riguros rezultatele experimentale observate din măsurarea proprietăţilor electrice ale membranelor celulare trebuie să facă uz şi de utilizarea riguroasă a ecuaţiei lui Poisson scrisă pentru mediul intermembranar pe unde

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

are loc transferul ionic. În acest fel, se pot genera diferite forme ale variaţiei potenţialului membranar cu distanţa în membrană. Teoria prezentată mai sus reprezintă una din cele mai simple şi des utilizate paradigme ale transportului transmembranar şi care, în ciuda simplităţii şi a ipotezelor simplificatoare pe care le presupune (e.g., variaţia liniară a potenţialului prin membrană, independenţa fluxurilor ionice unele în raport cu altele, excluderea fenomenelor electrice de la interfaţa membrana biologică–electrolit inter- sau extracelular), produce rezultate foarte consistente cu observaţiile experimentale. Ecuaţia lui Goldman – Hodgkin – Katz reproduce valori ale diferenţei de potenţial de repaus trans-membranar foarte apropiate cu cele măsurate experimental (~ -70 mV, în funcţie de sistemul celular considerat). În tabelul de mai jos, sunt prezentate valorile potenţialelor de echilibru Nernst pentru cele trei specii ionice importante în stabilirea diferenţei de potenţial transmembranare:

Tabel 6 Valorile potenţialelor de echilibru Nernst pentru cele trei specii ionice importante în stabilirea diferenţei de potenţial transmembranare.

Ion	Concentraţia extracelulară (mM)	Concentraţia intracelulară (mM)	$\frac{[ion]_o}{[ion]_i}$	Potenţial de echilibru Nernst (mV)
Na^+	145	12	12	+67
K^+	4	155	0.026	-98
Cl^-	123	4.2	29	-90

Trebuie remarcat faptul că diferenţa de potenţial de repaus transmembranar pentru orice celulă viabilă nu este egală cu nici unul din potenţialele Nernst pentru cele trei tipuri de ioni mai importante ce generează activitatea electrică celulară. În consecinţă şi prin prisma rezultatelor precedente, fluxurile ionice individuale vor fi diferite de zero (vezi ecuaţia lui Nernst aplicată pentru fiecare din cele trei specii ionice). Tradus altfel, putem aprecia că în timp, evoluţia dinamică a sistemului celular dictată de existenţa fluxurilor ionice individuale va fi spre egalizarea concentraţiilor ionice în mediile inter- şi extracelulare, ceea ce va determina o diferenţă de potenţial transmembranară nulă. În fond, aceasta este o altă reflexie a principiului II al termodinamicii, care postulează că orice sistem natural evoluează spre starea sa de entropie maximă. Din punct de vedere fiziologic însă, asemenea alterări ale diferenţei de potenţial trans-membranar, până la anularea sa, conduc la moartea electrică a celulei; ea nu va mai putea transmite sau primi informaţie prin intermediul potenţialelor de acţiune. În sens evolutiv, soluţia *Naturii* în rezolvarea acestei probleme a fost 'apariţia' (în sens evolutiv, evident) a pompei ionice electrogene de Na^+ - K^+ care utilizează energia conţinută în moleculele macroergice de ATP pentru transportul activ, împotriva gradientului de concentraţie, a ionilor de Na^+ în exteriorul celulei şi a celor de K^+ în mediul intercelular. În acest fel, este menţinut gradientul de

concentrație ionică transmembranar, ce este esențial în comportamentul electric al oricărei celule viabile. În cuvinte succinte, mâncăm pentru a produce ATP, pentru a folosi acest ATP la menținerea gradienților de concentrație ionică între mediile intra- și extracelulare, pentru a avea celule cu potențial de repaus diferit de zero și care vor putea comunica prin intermediul potențialelor de acțiune.

Relația dedusă mai sus (204) este extrem de importantă pentru caracterizarea cantitativă a uneia din cele mai importante proprietăți ale canalelor ionice și a porinelor: selectivitatea ionică. Exprimat extrem de simplu și fără să facem referiri la detalii structurale, selectivitatea ionică presupune mobilități diferite pentru speciile ionice difuzante prin membranele respective. Pentru a înțelege cum se poate determina experimental, cu ajutorul relației de mai sus, raportul de selectivitate ionică pentru difuzia a două specii ionice printr-un nanopor oarecare, să ne imaginăm următorul experiment mintal: să presupunem că între mediile (i) și (o) definite mai sus există un gradient de concentrație pentru două specii ionice (Na^+ și Cl^-) ce provin din disocierea, să spunem, a clorurii de sodiu în apă, și care au mobilitățile descrise de (P_{Na^+}, P_{Cl^-}). Similar, să presupunem că aplicăm o diferență de potențial între cele două medii. Relația de dependență între valoarea densității totale de curent electric ionic și diferența de potențial aplicată este, așa cum a fost definită mai sus:

$$I_{total} = I_{Na^+} + I_{Cl^-} \tag{205}$$

sau:

$$I_{total} = F\left(P_{Na^+} v_i \frac{C_{Na^+}^{(o)} - C_{Na^+}^{(i)} e^{v_i}}{1 - e^{v_i}} + P_{Cl^-} v_i \frac{C_{Cl^-}^{(i)} - C_{Cl^-}^{(o)} e^{v_i}}{1 - e^{v_i}} \right) \tag{206}$$

În funcție de valoarea diferenței de potențial aplicate din exterior, densitatea de curent electric total măsurat va varia așa cum este dat de relația de mai sus (206).

Dacă dorim să stabilim o așa valoare pentru diferența de potențial aplicată din exterior ($V_{eq.}$) care să cauzeze anularea curentului electric total măsurat, ea ar trebui să fie soluția ecuației:

$$I_{total} = F\left(P_{Na^+} v_i \frac{C_{Na^+}^{(o)} - C_{Na^+}^{(i)} e^{v_i}}{1 - e^{v_i}} + P_{Cl^-} v_i \frac{C_{Cl^-}^{(i)} - C_{Cl^-}^{(o)} e^{v_i}}{1 - e^{v_i}} \right) = 0 \tag{207}$$

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Astfel:

$$V_{eq.} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na^+} C_{Na^+}^{(o)} + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^{(i)}}{P_{Na^+} C_{Na^+}^{(i)} + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^{(o)}} \tag{208}$$

Această diferenţă de potenţial (V_{eq}) asigură condiţiile fizice pentru care un element de suprafaţă din mediul de difuzie considerat este străbătut de un număr egal de sarcini pozitive şi negative care se mişcă dirijat şi în acelaşi sens; în acest caz, valoarea totală de sarcină electrică transportată va fi nulă, iar curentul electric corespunzător, egal cu zero. Dacă notăm prin $\frac{P_{Na^+}}{P_{Cl^-}} = w$ raportul (necunoscut, încă) între permeabilităţile ionilor de sodiu şi, respectiv, de clor, din relaţia de mai sus deducem:

$$w = \frac{C_{Cl^-}^{(i)} - C_{Cl^-}^{(0)} e^{\frac{F}{RT} V_{eq.}}}{C_{Na^+}^{(i)} e^{\frac{F}{RT} V_{eq.}} - C_{Na^+}^{(o)}} \tag{209}$$

Aşadar, un parametru extrem de important ce caracterizează fenomenele de transport prin structuri specifice de nanopori membranari şi care este dat de raportul între permeabilităţile ionilor difuzanţi, poate fi relativ uşor de determinat experimental dacă măsurăm valoarea V_{eq}.

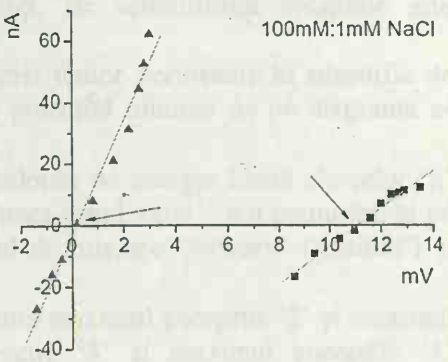


Figura 66 Diagrama curent – tensiune utilizată pentru caracterizarea cantitativă a fenomenului de selectivitate ionică parţială a unor nanopori polimerici acoperiţi cu aur, şi pe care sunt adsorbiţi ioni de clor (simboluri pătrate). În condiţiile indicate de gradienţi ionici (100 mM:1 mM NaCl), prin determinarea $V_{eq.}$ (indicată prin săgeată) se poate determina raportul între permeabilităţile ionilor de sodiu şi, respectiv, de clor. În cazul utilizării unei membrane polimerice 'control' ai cărei nanopori sunt neauriţi (simboluri triunghiulare), valoarea cvasinulă a valorii $V_{eq.}$ (indicată prin săgeată) este o bună indicaţie a lipsei proprietăţii de semiselectivitate ionică.

BCU CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Cea mai utilizată metodă experimentală în acest sens este de a trasa diagrama curent-tensiune pentru sistemul respectiv (Fig. 66); din analiza respectivei diagrame se poate determina simplu punctul de intersecţie al respectivului grafic cu axa 'x', care defineşte tocmai V_{cq}.

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8 TEORIA LUI EYRING DE DESCRIERE MACROSCOPICĂ A FENOMENELOR DE TRANSPORT PRIN NANOPORI. IMPLEMENTAREA MODELULUI EYRING *'TWO-SITES-THREE-BARRIERS*

Un alt model destul de folosit în studiile de simulare a mişcării ionilor prin canale ionice utilizează abordarea lui Eyring (propusă de H. Eyring încă din anul 1949 şi continuată de alţi autori în deceniile următoare (P. Lauger în 1973, B. Hille în 1975, C. Miller în 1980 etc.). În această teorie, se presupune că permeaţia ionilor prin canale ionice are loc ca o mişcare dirijată şi în continuă interacţiune cu canalul ionic, într-un profil definit al energiei potenţiale totale. Acest profil de energie potenţială totală este constituit din maxime energetice, corespunzătoare stărilor de tranziţie ale complexelor moleculare canal ionic – ion difuzant, şi minime energetice ce corespund situsurilor de legătură dintre ion şi porul canalului ionic. Spre deosebire de cazul teoriei Nernst-Planck, în care procesul de difuzie ionică era considerat ca fiind unul 'spaţial-fluid' (continuu), difuzia ionică în cadrul teoriei lui Eyring este imaginată ca o serie de 'salturi' ale ionului permeant dintr-un minim energetic într-altul, 'alimentate' energetic de energia termală din mediul înconjurător. În cadrul acestui model, se neglijează frecările dintre ionii permeanţi şi mediul de difuzie – după cum au fost descrise anterior.

În figura de mai jos (Fig. 67), este reprezentată schematic diagrama energetică a porului prin care difuzează ionii permeanţi, iar semnificaţia notaţiilor este următoarea:

- c_1, c_2, ...c_n sunt concentraţiile speciei ionice permeante în situsurile de legătură, ce corespund valorilor energetice de potenţial minime de pe diagrama energetică corespunzătoare;
- ΔG_1, ΔG_{-1} ... ΔG_{n-1}, $\Delta G_{-(n-1)}$ sunt valorile de energie liberă ale celor 'n' bariere energetice considerate, date de interacţiunea canal ionic – ion permeant, şi pe care ionii trebuie să le surmonteze în procesul de mişcare *'forward'* ('înainte') şi *'backward'* ('înapoi');
- δG_2, δG_3... reprezintă diferenţele între maximul energetic '2' şi maximul energetic '1', respectiv între maximul energetic '3' şi maximul energetic '1' (raţionament analog pentru toţi δG_n);
- λ_1, λ_2,...λ_n reprezintă distanţele geometrice între maxime energetice succesive;

- k_1, k_{-1} reprezintă constantele de tranziție ale ionului difuzant peste primul maxim energetic din structura de por a canalului ionic, pentru reacțiile '*forward*' și '*backward*' (notații analoage pentru celelalte maxime energetice);
- $G_1..G_n$ reprezintă valorile absolute ale energiilor libere corespunzătoare 'gropilor' de potențial de pe diagrama energetică corespunzătoare.

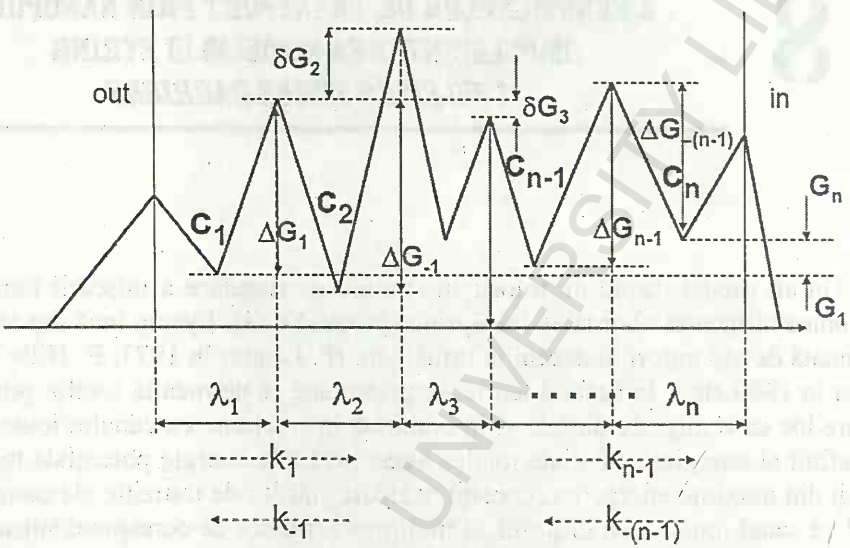


Figura 67 Diagrama energetică a profilului de energie totală ce caracterizează interacțiunile ion permeant – por în procesul de permeație ionică, în aproximarea modelului Eyring.

În diagrama schematizată în Fig. 67, profilul energetic – descris simplificat prin linii – ce corespunde variației energiei libere de interacțiune a sistemului por – ion permeant, cu maximele și minimele corespunzătoare, poate fi foarte complex în expresie analitică; el conține mai mulți termeni energetici, ce apar din procesul de interacțiune nemijlocit între ionul permeant și aminoacizii ce constituie structura de por a canalului ionic. Cei mai importanți termeni din această expresie sunt:

- componenta electrostatică, dată de interacțiunile electrostatice între ionul permeant și sarcinile nete electrice sau dipolare, fixe sau induse, ale porului canalului ionic
- componenta de hidratare, ce apare ca o diferență între energia de interacțiune ion permeant – molecule de apă (ce formează complexul ion hidratat) și energia de interacțiune ion permeant – por.

Singurul termen energetic suplimentar care poate apărea în schema de mai sus, în procesul de permeație ionică, este cel de interacțiune electrică între ionul permeant și un câmp electric extern, cum apare în cazul în care între cele două medii ale biomembranei se aplică o diferență de potențial externă ΔU.

Locațiile geometrice din schema de mai sus corespunzătoare minimelor energetice reprezintă situsuri în care afinitatea energetică a porului permeant pentru

ionii permeanţi este cea mai mare (poziţii în care ionii permeanţi interacţionează cel mai favorabil cu porul canalului ionic). În aceste situsuri, valoarea energiei de interacţiune a canalului ionic cu ionul permeant este mare în valori negative (deci reprezintă locaţii de echilibru stabil pentru ionii permeanţi). Situsurile topologice corespunzătoare maximelor energetice (în valori pozitive – '*peak*'-uri) din schema de permeaţie de mai sus pot fi asimilate cu regiuni din structura porului unde interacţiunea canal ionic – ion permeant devine puţin mai 'ne-favorabilă' energetic, în comparaţie cu cazurile precedente. Trebuie subliniat că aceste maxime energetice, ce constituie bariere de potenţial pentru difuzia ionilor permeanţi, nu sunt mai mari decât ~ 5kT; chiar şi aici, interacţiunea canal ionic – ion permeant este favorabilă energetic, însă mai puţin în comparaţie cu situaţia precedentă (i.e., minimele energetice); dacă nu ar fi aşa, un ion ar trebui să devină complet dehidratat la saltul peste o asemenea barieră de energie. Aceasta ar face ca energia de activare a ionului ($G_{peak} - G_{minim}$) la difuzia peste o barieră energetică să fie prohibitiv de mare şi deci curentul electric mediat de canalul ionic ar deveni insignifiant pentru asigurarea îndeplinirii funcţiilor biofizice ale biomembranelor. În acest model care explică procesul de permeaţie printr-un canal ionic, ionul permeant difuzează din mediul extracelular (de exemplu) în prima locaţie energetică cea mai favorabilă (i.e., primul minim energetic) din structura porului. În acest fel, ionul a 'pierdut' câteva din moleculele de apă de hidratare, iar interacţiunea sa electrostatică cu grupările aminoacidice din porul permeant favorizează starea energetică stabilă a acestuia. În mod fizic similar, el difuzează peste toate barierele energetice; în locaţia cu bariera energetică maximă (i.e. filtrul de selectivitate), ionul devine complet dehidratat şi interacţionează astfel doar cu aminoacizi ce compun acest 'filtru' ionic. Mai departe (în procesul de difuzie), ionul devine parţial hidratat, până la eliberarea sa în mediul intracelular unde redevine total hidratat.

În cadrul modelului prezentat mai sus, fluxul net de ioni permeanţi peste bariera energetică 'i' este dat de:

$$J_i = k_i N_i - k_{-i} N_{i+1}$$

$$deci: \qquad (210)$$

$$J_i = k_i c_i \lambda_i - k_{-i} c_{i+1} \lambda_{i+1}$$

unde N_i şi N_{i+1} reprezintă numărul mediu de ioni permeanţi din locaţiile (i) şi, respectiv (i+1), iar secţiunea transversală a porului se consideră egală cu unitatea.

În acest model al lui Eyring, constantele de reacţie ce corespund diferitelor tranziţii ionice '*forward*' sau '*backward*' prin porul canalului ionic, se consideră într-o primă aproximaţie ca fiind date de teoria stării de tranziţie ('*transition rate theory*') utilizată curent în chimie pentru a cuantifica interacţiile chimice din punct de vedere energetic:

$$k_1 = \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta G_1^0}{RT}}$$

$$k_{-1} = \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta G_{-1}^0}{RT}}$$

.....

$$k_{n-1} = \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta G_{n-1}^0}{RT}}$$

$$k_{-(n-1)} = \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta G_{-(n-1)}^0}{RT}} \qquad (211)$$

În aceste expresii, ΔG_i^0 sunt exprimate ca diferențe de energii per mol și evaluate în condiții standard de presiune și temperatură.

În condiții de staționaritate, fluxul J este același oriunde în interiorul porului permeant și deci același pentru fiecare barieră energetică:

$$\begin{aligned} J &= k_1 c_1 \lambda_1 - k_{-1} c_2 \lambda_2 \\ J &= k_2 c_2 \lambda_2 - k_{-2} c_3 \lambda_3 \\ J &= k_{n-1} c_{n-1} \lambda_{n-1} - k_{-(n-1)} c_n \lambda_n \end{aligned} \qquad (212)$$

Eliminând din sistemul de ecuații de mai sus valorile intermediare ale lui $c_i\lambda_i$ și procedând la operații algebrice simple, rezultă următoarea expresie pentru valoarea fluxului ionic prin porul conductiv:

$$J = \frac{\lambda_1 k_1 \left[c_1 - \left(\frac{\lambda_n}{\lambda_1} \right) \left\{ e^{\frac{G_n^0 - G_1^0}{RT}} \right\} c_n \right]}{1 + e^{\frac{\delta G_2^0}{RT}} + e^{\frac{\delta G_3^0}{RT}} + \ldots e^{\frac{\delta G_{n-1}^0}{RT}}} \qquad (213)$$

BCU IAȘI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

unde semnificaţia termenilor este aşa cum a fost arătată mai sus, iar în aceste expresii δG_i^0 sunt exprimate ca diferenţe de energii per mol, şi evaluate în condiţii standard de presiune şi temperatură.

În ciuda expresiei relativ complicate, relaţia de mai sus (213) poate fi uşor adaptată pentru modele de permeaţie simplificate (e.g., cu un număr finit de bariere energetice, bariere energetice identice, modele în care doar un singur ion poate fi localizat într-un situs de legătură la un moment dat etc.). Corelând datele experimentale din experimente de '*patch-clamp*' cu rezultatele unor astfel de modele de permeaţie, se pot imagina diferite structuri energetice ale porului permeant, cu posibile reflectări în realitate, verificabile prin procedee de electrofiziologie moleculară şi mutageneză.

Trebuie amintit că, prin comparaţie cu modelele de permeaţie discutate anterior, modelul lui Eyring este amendabil de o serie de dificultăţi fizice ce-i pot face discutabilă oportunitatea de aplicabilitate (cu excepţia cazurilor extrem de simple, când aceste dificultăţi exprimate mai jos pot fi relativ uşor eliminate):

1. Aşa cum este prezentat mai sus, modelul lui Eyring este aplicabil pentru situaţii în care barierele de energie descrise sunt relativ mari, în comparaţie cu energia de agitaţie termică; în caz contrar, constantele de reacţie incluse în model, referitoare la tranziţiile peste maxime energetice consecutive devin limitate de procesele de difuzie în mediul apos din interiorul porului ('*difussion-controlled reactions*').

2. Se presupune că profilul barierelor energetice respective nu este variabil în funcţie de concentraţia ionilor permeanţi sau a diferenţei de potenţial aplicată din exterior.

3. Corelarea fizico-chimică a existenţei barierelor energetice cu elementele de structură a canalului ionic studiat este, de obicei, deficitară.

4. Constantele de reacţie ce corespund diferitelor tranziţii ionice '*forward*' sau '*backward*' prin porul canalului ionic se consideră, într-o primă aproximaţie, ca fiind date de teoria stării de tranziţie aplicabilă numai pentru modele de reacţie în fază gazoasă; dacă se utilizează acele constante de reacţie derivate din teoria reacţiilor chimice în faze condensate, teoria lui Eyring nu poate prezice corect fenomenele de transport prin canale ionice.

Pentru a exemplifica însă un caz concret în care câteva din deficienţele exprimate mai sus ar putea fi ajustate, prezentăm mai jos date de cristalografie proteică realizate pe un canal ionic de potasiu (KscA) în grupul lui R. MacKinnon (Fig. 68). Astfel, aceste rezultate permit vizualizarea filtrului de selectivitate ionică al acestui canal ionic şi identifică explicit situsurile geometrice de interacţiune minimă între ionii de potasiu şi porul permeant. Odată cu evidenţierea faptului că procesul de permeaţie al ionilor de potasiu are loc, în acest caz, în 'şir indian' ('*single file*') – în interiorul domeniului permeant ce are rol de filtru de selectivitate nu se pot afla mai mult de doi ioni în acelaşi timp – face ca teoria lui Eyring să aibă mai mult fundament fizic de aplicabilitate pentru modelarea procesului de transport ionic decât teoria Nernst – Poisson – Planck.

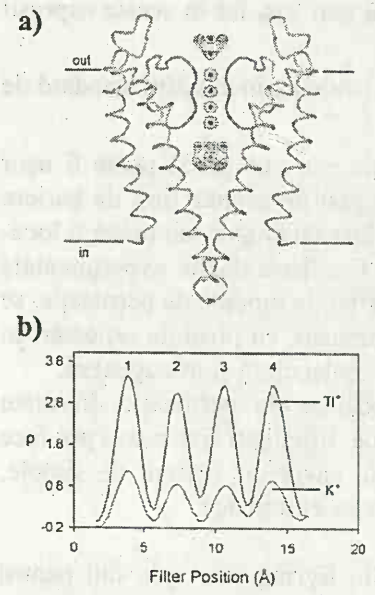


Figura 68 Modelul de permeaţie al ionilor de potasiu prin canalul ionic de potasiu KscA, aşa după cum a fost elaborat în urma unor experimente de cristalografie cu raze X. În panelul (a) este arătat schematizat modul de dispunere în 'şir indian' ('*single file*') al ionilor de potasiu ce traversează filtrul de selectivitate al acestui canal ionic. În panelul (b) sunt evidenţiate profilele de densitate electronică ale ionilor de Tl^+ şi K^+ în procesul de permeaţie, şi care ilustrează situsurile de interacţiune dintre respectivii ioni şi structura internă a filtrului de selectivitate ionică (adaptat din *Y. Zhou and R. MacKinnon, J. Mol. Biol. 333, 2003*).

Un caz particular de aplicare a teoriei expuse mai sus este cel de modelare a permeaţiei ionilor de potasiu printr-un canal ionic de potasiu (GIRK1/GIRK5). În acest caz, porul permeant al canalului ionic a fost modelat, în cel mai simplu caz, ca şi când ar conţine doar două situsuri cu energie minimă de interacţiune al complexelor 'ion de potasiu – por' (notate cu G_2 şi G_3) cu lungimea totală egală cu unitatea ($2D_1 + 2D_2 + 2D_3 = 1$). Exprimate ca diferenţe de energii per mol şi evaluate în condiţii standard de presiune şi temperatură, barierele energetice de traversat de către ionii de potasiu în procesul de permeaţie sunt constituite de G_{12}, G_{23} şi G_{34} ; astfel, în modelul de faţă, prima barieră energetică (G_{12}) este asociată cu 'saltul' ionic peste bariera dielectrică 'mediu extracelular – biomembrană', (G_{23}) este asociată cu 'saltul' ionic în interiorul porului permeant, iar (G_{34}) este asociată cu 'saltul' ionic din biomembrană spre mediul intracelular. Suplimentar, distribuţia de energii ce compun aceste bariere energetice este considerată a fi simetrică, în raport cu coordonata spaţială unidimensională (asemănătoare cu o funcţie de distribuţie de tip Gauss); pentru exemplificare, maximul 'G_{23}' este deci dispus la jumătatea distanţei fizice între situsurile G_2 şi G_3. Linia punctată reprezintă simplificat variaţia potenţialului electric prin porul permeant; mediul extracelular '*out*' se consideră a fi la potenţial nul, iar potenţialul aplicat pe partea intracelulară a membranei este V_m.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

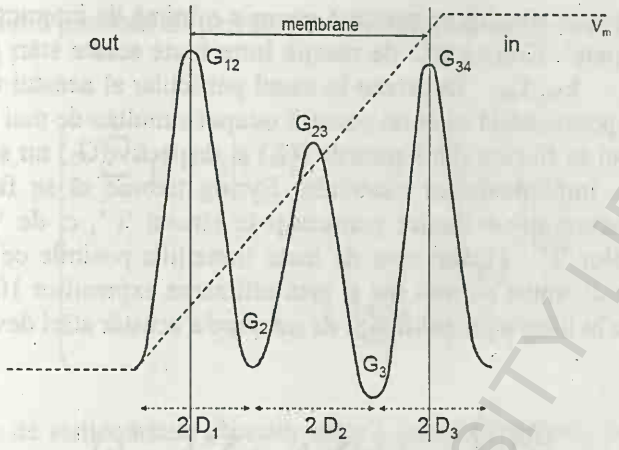


Figura 69 Modelul Eyring implementat pentru modelarea proceselor de permeaţie printr-un canal ionic de potasiu, în ipoteza în care acesta ar conţine doar două situsuri cu energie minimă de interacţiune al complexelor 'ion de potasiu – por'.

Cu toate că nu a fost indicat explicit pentru a nu complica reprezentarea figurii de mai sus, trebuie menţionat că în prezenţa acestui potenţial, valorile energetice molare G_2 şi G_3 vor fi alterate cu termeni $(N_A z e^- V_m 2D_1)$ şi, respectiv, $(N_A z e^- V_m (1-2D_3))$, unde e^- este sarcina electronică elementară, N_A este numărul lui Avogadro, iar pentru ionii de potasiu permeabili prin acest canal ionic z = +1.

În reprezentare cinetică, schema de reacţie ce conţine tranziţiile între toate stările posibile pentru complexul 'ion de potasiu – por' este aşa cum am prezentat mai jos.

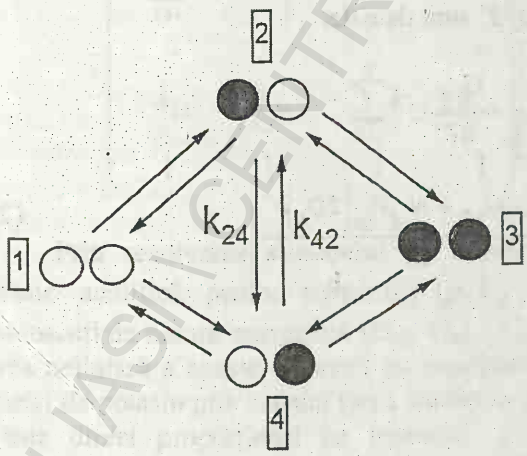


Figura 70 Schema de reacţie ce conţine tranziţiile între toate stările posibile pentru complexul 'ion de potasiu – por' aplicabilă modelului Eyring în ipoteza în care acesta ar conţine doar două situsuri cu energie minimă de interacţiune al complexelor 'ion de potasiu – por'.

Astfel, starea '1' este asociată cu porul permeant ce nu conţine ioni de potasiu; stările '2' şi '4' sunt asociate cu prezenţa unui ion de potasiu în primul situs cu energie minimă (G_2) şi, respectiv, în al 2-lea asemenea situs (G_3), iar starea '3' este asociată cu

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

situația în care ambele situsuri ce prezintă energie minimă de interacțiune cu ionii de potasiu sunt 'ocupate'. Constantele de reacție între toate aceste stări moleculare sunt notate cu k_{12}, k_{23},... k_{24}, k_{42}... Deoarece în cazul particular al acestui canal de potasiu există evidența experimentală că el nu poate fi ocupat simultan de mai mult de doi ioni de potasiu – și deci în fiecare din situsurile (G_2) și respectiv (G_3) nu se poate afla mai mult de un ion – implementarea modelului Eyring trebuie să se facă utilizând nu conceptul de 'concentrație a ionilor permeanți în situsul 'i'', ci de 'probabilitate de ocupare a situsurilor 'i''. Ținând cont de toate tranzițiile posibile ce pot exista între stările moleculare distincte de mai sus și prin utilizarea expresiilor 102-104, ecuațiile ce descriu variația în timp a probabilității de ocupare a acestor stări devin:

$$\frac{dp_1(t)}{dt} = -p_1(t)\sum_{j\neq 1}^{4} k_{1j} + \sum_{j\neq 1}^{4} k_{j1}p_j(t)$$

$$\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots \qquad (214)$$

$$\frac{dp_4(t)}{dt} = -p_4(t)\sum_{j\neq 4}^{4} k_{4j} + \sum_{j\neq 4}^{4} k_{j4}p_j(t)$$

unde $p_j(t)$ se referă la probabilitatea de ocupare a stării 'j', iar k_{ij} sunt constantele de reacție pentru tranzițiile între diferitele stări 'i' și 'j' (vezi mai sus).

În prezența unei diferențe de potențial aplicate între mediile '*out*' (extern) și '*in*' (intern), notând cu $[K_{out}]$ valoarea concentrației în mediul '*out*' a ionilor de potasiu și utilizând teoria '*transition state theory*', constantele de reacție pentru tranzițiile între stările moleculare '1' și '2' sunt date de:

$$k_{12} = ct.[K_{out}]e^{-\frac{G_{12}}{RT}}$$

$$k_{21} = ct.e^{-\left[\frac{G_2 - G_{12} + N_A V_m (2D_1)e^-}{RT}\right]} \qquad (215)$$

unde:

$$ct. = \frac{kT}{h}$$

Similar, se pot scrie expresii care să descrie tranzițiile moleculare între celelalte stări moleculare reprezentate mai sus. Dacă suntem interesați doar de soluția ce descrie starea staționară a sistemului de mai sus – pentru că în această stare,

presupunem a studia procesul de permeaţie – ecuaţiile de mai sus se pot scrie în forma matricială, astfel :

$$\begin{pmatrix} -\sum_{j\neq 1}^{4} k_{1j} & k_{21} & k_{31} & k_{41} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ k_{14} & k_{24} & k_{34} & -\sum_{j\neq 4}^{4} k_{4j} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} p_1 \\ p_2 \\ p_3 \\ p_4 \end{pmatrix} = 0 \qquad (216)$$

În starea de staţionaritate (‘*steady-state*’), curentul electric net prin acest canal ionic astfel modelat este dat de fluxul ionic peste oricare din cele trei bariere energetice prezentate mai sus şi este proporţional cu:

$$J_{steady-state} \approx (p_2 k_{24} - p_4 k_{42}) \qquad (217)$$

Ştiind că ($\sum_{i=1}^{4} p_i = 1$) şi deci ($p_4 = 1 - p_1 - p_2 - p_3$), sistemul de mai sus (216) devine:

$$\begin{pmatrix} -\sum_{j\neq 1}^{4} k_{1j} & k_{21} & k_{31} & k_{41} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ k_{13} & k_{23} & -\sum_{j\neq 3}^{4} k_{3j} & k_{43} \\ 1 & 1 & 1 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} p_1 \\ p_2 \\ p_3 \\ 1-p_1-p_2-p_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix} \qquad (218)$$

Prin rezolvarea sistemului de ecuaţii cuplate (218), putem determina o expresie analitică pentru termenul $(p_2 k_{24} - p_4 k_{42})$ ce va conţine parametrii necunoscuţi de natură energetică (G_{12}, G_{23}.., G_2, G_3) şi geometrică (D_1, D_2, D_3). Prin fitarea neliniară a acestei expresii cu rezultatele experimentale ce identifică curenţii electrici de potasiu prin canalul ionic studiat la diferite diferenţe de potenţial aplicate – ce este direct proporţional cu termenul $J_{steady-state}$, se pot obţine valori aproximative pentru parametrii necunoscuţi ai modelului nostru (Fig. 71).

BCU MF CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

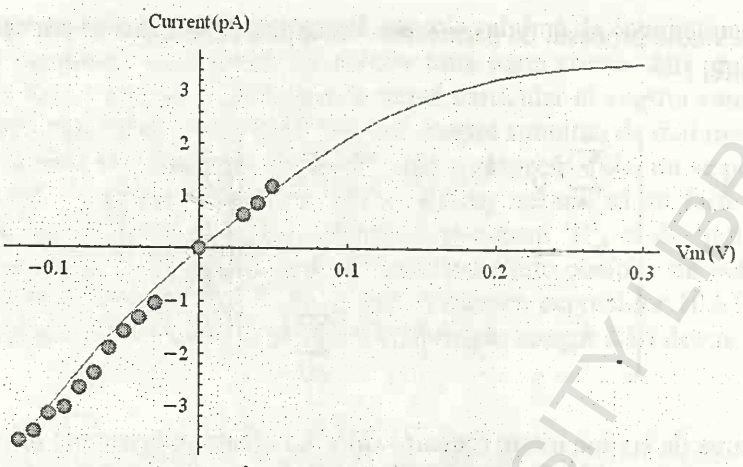


Figura 71 Diagrama curent – tensiune trasată experimental pentru descrierea proceselor de transport ale ionilor de potasiu printr-un canal ionic (GIRK1/GIRK5) (cercuri pline). Prin fitarea neliniară a acestor date experimentale cu predicțiile modelului Eyring '*two-sites-three-barriers*' (linia continuă), s-au putut determina valori numerice ce caracterizează energetica şi geometria respectivului model.

În cazul în care $\frac{[K_{out}]}{[K_{in}]} = 1.07$, s-au obținut următoarele valori pentru parametrii modelului '*two-sites-three-barriers*' care modelează transportul ionic prin canalul ionic de potasiu (GIRK1/GIRK5): G_{12} = 8.25 RT, G_{23} = 3.96 RT, G_{34} = 8.86 RT, G_2 = -2.76 RT, G_{12} = -2.56 RT, D_1 = 0.09, D_3 = 0.29. Cu toate că este tentant a se asocia asemenea valori cu descrierea reală a canalului ionic studiat, nu trebuie uitate simplificările în baza cărora a fost implementat modelul de față şi care îşi pot pierde conținutul în diferite cazuri particulare studiate.

Fiecare din modelele de permeație prezentate până acum furnizează informații utile despre mecanismele proceselor de difuzie prin canale ionice. Cu toate acestea, este incorect să afirmăm că doar unul din modelele descrise reprezintă realitatea fizică asimilată acestor procese; ele nu sunt altceva decât aproximații grosiere ale acestor fenomene. Astfel, pentru alegerea unui model care să încerce explicarea datelor experimentale referitoare la permeația prin canale ionice şi nanopori proteici, poate să devină oportună exprimarea extrem de concisă a lui B. Eisenberg în acest sens: motivația implementării şi utilizării unui model trebuie să fie justificată de *'...fundamental of principles of science, namely to derive theories from principles and physical models and then test those theories against experiments. If there is no sensible physical model that gives an equation, checking that equation against experiments has only limited use, and no physical meaning'.*

BCU CLUJ / BABEŞ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

9 METODA '*VOLTAGE-CLAMP*' ŞI UTILITATEA EI ÎN ELECTROFIZIOLOGIA MOLECULARĂ

Aşa după cum se cunoaşte, funcţionarea integrativă şi coerentă a sistemului nervos se bazează fundamental pe utilizarea potenţialelor de acţiune pentru generarea, codarea şi procesarea informaţiei schimbate între celulele implicate. Într-o exprimare morfologico-anatomică simplă care să reflecteze bine structura şi funcţia sa, putem privi orice celulă nervoasă ca fiind alcătuită din trei regiuni principale (Fig. 72):

- corpul neuronal (soma);
- dendritele;
- axonul.

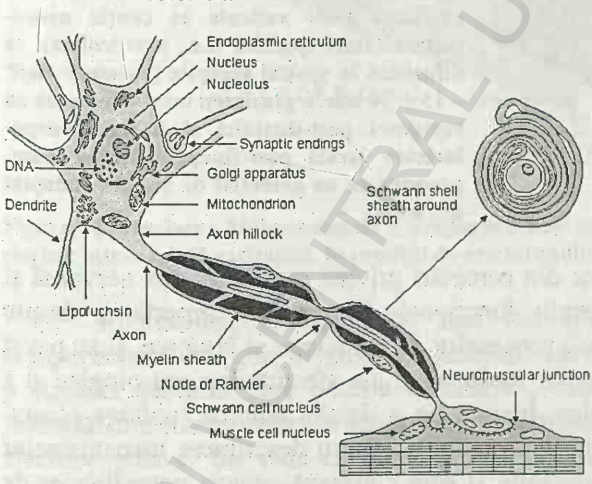


Figura 72 Particularităţile structurale fundamentale ale unui neuron implicat în conducerea informaţiei nervoase spre muşchii striaţi (adaptat din *www*).

Corpul neuronal este similar structural cu cel al altor celule, conţinând nucleul, mitocondrii, reticulul endoplasmatic, ribozomi, precum şi alte organele. Ar trebui reţinut că, raportat la masa lor totală, celulele nervoase conţin 70-80 % apă, iar 'materia uscată' este reprezentată de 80 % proteine şi 20 % lipide. De asemenea, volumul celulelor nervoase variază între 600 şi 70.000 μm^3. Explicat simplu, comunicarea prin intermediul potenţialelor de acţiune între celule excitabile are loc astfel: dendritele unei celule nervoase primesc, prin intermediul sinapselor, informaţii codate în potenţiale de acţiune de la alte celule excitabile. În funcţie de natura funcţională a sinapselor implicate în

acest proces, aceste informații pot fi excitatoare (când determină depolarizarea celulei 'țintă') sau inhibitoare (când determină hiperpolarizarea celulei 'țintă'). Trebuie, de asemenea, reținut că o celulă excitabilă 'țintă' – un neuron cortical, în particular – primește informații simultane de la mii până la sute de mii de alți neuroni. În continuare, informația este transmisă (tot) prin intermediul potențialelor de acțiune spre axon, iar mai departe spre altă celulă 'țintă', ce poate fi o celulă nervoasă, celula musculară (Fig. 73) sau glandulară. Axonii celulelor nervoase aparținând mamiferelor au un diametru cuprins între 1 și 20 μm, iar lungimea lor poate atinge chiar metri. Unii axoni sunt acoperiți cu un strat ce are proprietăți electrice izolatoare, denumit teacă de mielină și care este formată, în principal, din celule Schwann. Prezența tecii de mielină este esențială pentru transmiterea cu viteză optimă a potențialelor de acțiune, pentru a asigura un bun timing în comunicarea intercelulară. Teaca de mielină nu este distribuită continuu pe suprafața externă a axonilor, ci este divizată în secțiuni distincte separate de nodurile Ranvier.

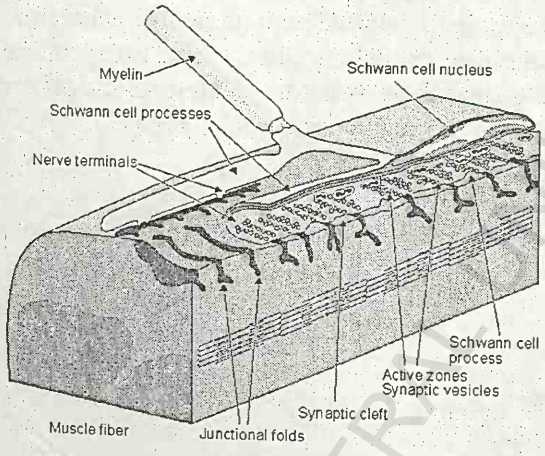


Figura 73 Particularitățile structurale fundamentale ale plăcii neuromusculare, ce reprezintă joncțiunea anatomică între neuroni și mușchi striat. Depolarizarea membranară pre-sinaptică locală conduce la exocitoza unor vezicule ce conțin neurotransmițători specifici (i.e., acetilcolina), ce difuzează în spațiul sinaptic ('*synaptic cleft*' – 15 ÷ 30 nm în grosime), interacționează cu receptori post-sinaptici și induc o depolarizare locală post-sinaptică ce se autopropagă ca un potențial de acțiune (adaptat din *www*).

Rezultatele științifice derivate din cercetări privind excitabilitatea nervoasă și transmisia sinaptică au furnizat detalii funcționale extrem de importante despre mecanismele celulare și moleculare ale proceselor de memorare și învățare, și au pavat drumul pentru înțelegerea mecanismelor moleculare ale afecțiunilor neurologice și a modului de acțiune a medicamentelor. Înainte de a detalia tehnica '*voltage-clamp*' (sau a 'voltajului-fixat') și a sublinia importanța ei pentru descifrarea mecanismelor transferului ionic prin membrane excitabile și care cauzează geneza potențialelor de acțiune, vom prezenta în continuare câteva idei despre potențialele de acțiune celulare. Așa după cum este cunoscut, în absența oricărui stimul extern sau a unor modificări celulare metabolice sau biochimice, orice celulă excitabilă se găsește într-o stare de staționaritate caracterizată de o valoare cvasinulă a curentului electric total ce traversează biomembrana și, implicit, a unei diferențe de potențial relativ constantă în timp, ce este denumită potențial de repaos celular. Dacă această celulă excitabilă este stimulată cu un semnal extern, ce poate fi un factor fizic sau chimic, diferența de potențial celular de repaos se modifică, fapt ce este cauzat de o alterare a distribuției

sarcinilor electrice din mediile intra- şi extracelular. Procesul de stimulare poate fi excitator, iar în acest caz efectul stimulării este depolarizarea membranei celulare sau inhibitor, situaţie în care diferenţa de potenţial celular devine mai mare în valoarea absolută decât potenţialul de repaos celular. În cazul unui stimul excitator, distingem următoarele situaţii: dacă amplitudinea pulsului de depolarizare este insuficientă pentru a se atinge o valoare critică ('*threshold*') de la care celula continuă să se autodepolarizeze chiar şi după încetarea acţiunii pulsului excitator, răspunsul celulei este pasiv. Această 'pasivitate' de reacţiune trebuie înţeleasă, în sensul că modificarea de diferenţă de potenţial celular indusă de pulsul excitator se propagă decremental, spaţio-temporal.

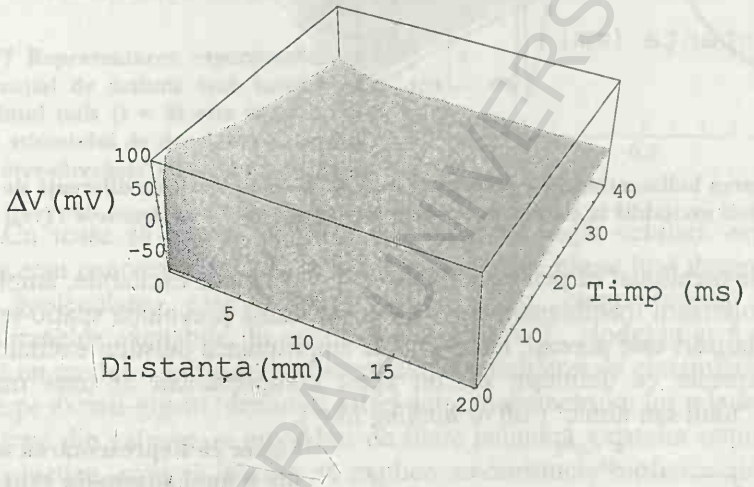


Figura 74 Simularea bidimensională a propagării unei perturbaţii locale de diferenţa de potenţial electric într-o celulă excitabilă, în condiţii de excitare subliminală ('*sub-threshold*') (vezi text).

Reprezentat în figura de mai sus (Fig. 74) este răspunsul simulat al comportamentului pasiv al unei biomembrane excitabile, dedus din rezolvarea numerică a ecuaţiei cablului care descrie cantitativ variaţia spaţio-temporală a diferenţei de potenţial transmembranar în lungul unei membrane idealizate, reprezentat cu circuite electrice pasive. Se vede că drept urmare a aplicării unui puls de depolarizare, în membrană apare o perturbaţie a diferenţei de potenţial – care iniţial a fost setată la -70 mV – ce variază continuu în timp şi spaţiu, cu pierdere de energie. Dacă magnitudinea pulsului de excitare depăşeşte însă valoarea impusă de '*threshold*', în volumul biomembranei se generează acel proces specific de propagare autoîntreţinută a unei depolarizări membranare, ce se numeşte potenţial de acţiune (Fig. 75).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

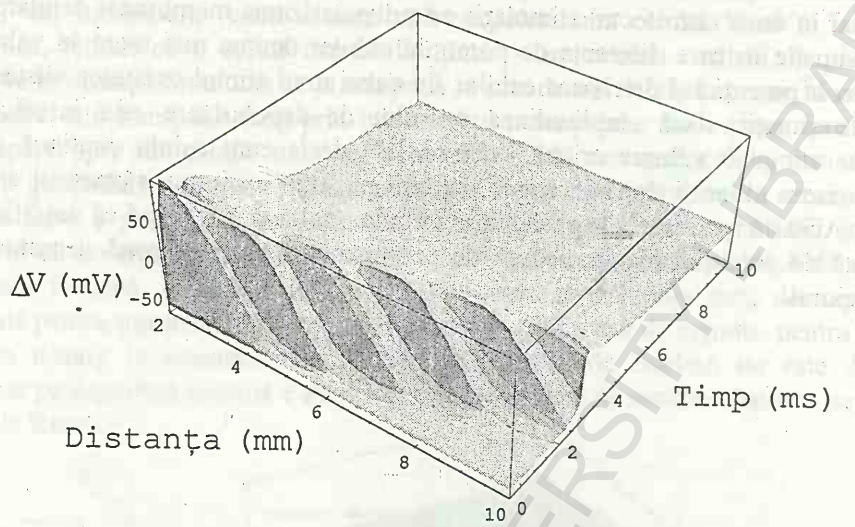


Figura 75 Simularea bidimensională a propagării unei perturbații locale de diferență de potențial electric într-o celulă excitabilă în condiții de excitare supraliminală ('*over-threshold*') (vezi text).

Trebuie menționat că pentru cazul unei singure celule excitabile, amplitudinea maximă a depolarizării membranare are valoare constantă și evoluția spațio-temporală a acestei depolarizări este aceeași, indiferent de amplitudinea pulsului excitator '*over-threshold*'. Expresia ce definește succint acest comportament al unei membrane excitabile este 'totul sau nimic' ('*all or nothing law*').

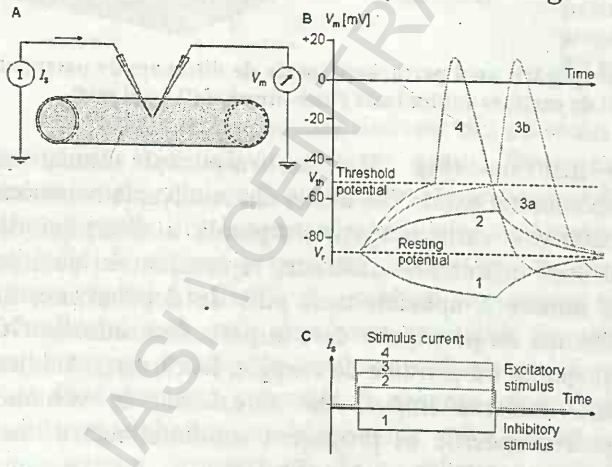


Figura 76 Reprezentarea schematiată a unui ansamblu experimental pentru stimularea unei membrane excitabile cu o sursă de curent ('*stimulus current*') și înregistrarea răspunsului celular. Dacă amplitudinea pulsului de excitare aplicat are efect de hiperpolarizare a biomembranei ('*inhibitory stimulus*'), răspunsul sistemului este de tip 'pasiv', așa după cum a fost prezentat anterior. În cazul unor stimuli depolarizanți ('*excitatory stimulus*') și în funcție de amplitudinea acestuia, în biomembrană se poate iniția un răspuns specific, identic cu cel discutat pentru procesele de excitare supra-liminală ('*over-threshold*') ce se identifică prin prezența și propagarea unui potențial de acțiune membranar (adaptat din *www*).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În figura de mai sus (Fig. 76), sunt descrise, pentru claritatea expunerii, caracteristicile principale ale variației temporale a potențialului de membrană în cele două cazuri de excitare membranară discutate anterior: '*sub-thershold*' și '*over-threshold*'. Rezultatele experimentale ale unei înregistrări locale de biopotențial membranar în condiții de inducere a unui potențial de acțiune sunt prezentate în cele ce urmează (Fig. 77).

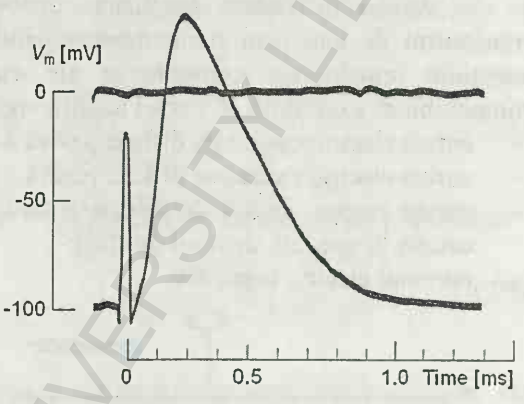


Figura 77 Reprezentarea experimentală a unui potențial de acțiune real, înregistrat local; primul puls (t = 0) este derivat din aplicarea stimulului de depolarizare supra-liminal ('*over-threshold*') (adaptat din *www*).

Cu toate că aceste rezultate de electrofiziologie celulară experimentală și teoretică erau cunoscute încă din anii 1940, nu se știa nimic însă despre mecanismele intime, moleculare, care făceau posibil acest comportament interesant al biomembranelor excitabile. În cursul anilor '50, A. L. Hodgkin și A. F. Huxley au formulat un model empiric derivat esențial din măsurători de electrofiziologie celulară realizate pe axonii-gigant (denumiți astfel datorită diametrului lor relativ mare de ~ 0.5 mm) extrași din calmari, și proceduri de fitare neliniară a datelor obținute cu diferite modele cinetice, care să încerce să explice mecanismele biofizice ale excitabilității celulare. În propriile lor cuvinte, Hodgkin și Huxley apreciau următoarele despre munca lor în acest sens: *'Our object here is to find equations which describe the conductances with reasonable accuracy and are sufficiently simple for theoretical calculation of the action potential and refractory period. For sake of illustration we shall try to provide a physical basis for the equations, but must emphasize that the interpretation given is unlikely to provide a correct picture of the membrane.' (Hodgkin and Huxley, 1952)*

În ciuda simplității sale mecaniciste și a multitudinii de ipoteze simplificatoare introduse, modelul Hodgkin-Huxley a fost prima încercare reușită de a înțelege excitabilitatea celulară prin prisma proceselor de transfer ionic prin biomembrane. Pentru munca lor, cei doi cercetători au primit premiul Nobel în anul 1963.

Fără a intra în detalii ce depășesc scopul acestei cărți, spuneam doar că din punct de vedere experimental, raționamentul celor doi cercetători, utilizat în încercarea de a descifra mecanismele de producere ale unui potențial de acțiune a fost simplu: o alterare a diferenței de potențial transmembranar, asociată (și) cu apariția unui potențial de acțiune, nu poate fi cauzată decât de alterarea continuă în timp și spațiu a fluxurilor ionice ce străbat o membrană excitabilă. Această afirmație este surprinsă

fizic extrem de elegant de binecunoscuta ecuație a lui Poisson (178), care exprimă legătura de interdependență între câmpul electric și sarcinile care-l generează. Suplimentar, alterarea continuă în timp și spațiu a fluxurilor ionice ce străbat o membrană excitabilă poate fi cauzată și de variația continuă a diferenței de potențial transmembranar, și de posibila variație temporală a conductivității electrice a biomembranei pentru diferitele specii ionice implicate.

Având în vedere rezultatele cunoscute până la acea dată privitoare la transportul de ioni prin biomembrane, Hodgkin și Huxley au considerat ca fiind esențiale următoarele componente ale curentului electric total ce traversa o biomembrană excitabilă, în cursul apariției unui potențial de acțiune:

- curent electric cauzat de difuzia pasivă a ionilor de sodiu;
- curent electric cauzat de difuzia pasivă a ionilor de potasiu;
- curent electric cauzat de difuzia pasivă a altor ioni (așa-numitul '*leak-current*', cauzat, în special, de ionii de clor);
- curentul electric capacitiv.

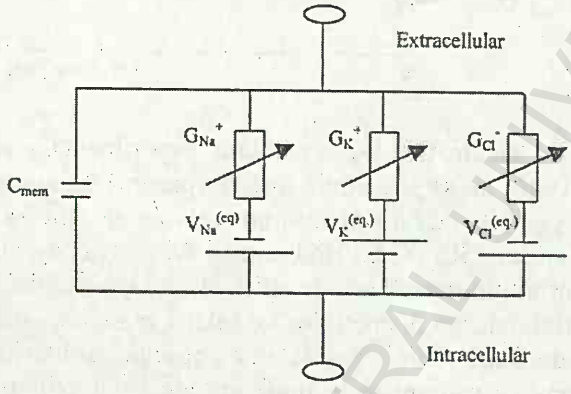


Figura 78 Cea mai simplă reprezentare diagramatică, cu elemente de circuit electric pasive, a unei membrane excitabile (vezi text).

În această schemă electrică echivalentă a unei membrane celulare simplificată (Fig. 78), semipermeabilă pentru mai multe specii ionice (sodiu, potasiu și clor), conductanțele electrice ce caracterizează macroscopic transportul ionic al celor trei specii de ioni sunt reprezentate prin G_{Na}^+, G_K^+ și G_{Cl}^-. Așa după cum au demonstrat cei doi cercetători, aceste conductanțe nu au valori constante, ci variază după o anumită formă, dependentă de timp și de diferența de potențial transmembranară; de aceea, s-a preferat reprezentarea lor ca elemente de circuit cu conductanță variabilă. Capacitatea electrică echivalentă a membranei celulare lipidice este reprezentată de C_M, iar potențialele nernstiene ale celor trei specii ionice de $V_{Na}^{(eq.)}$, $V_K^{(eq.)}$ și $V_{Cl}^{(eq.)}$.

Evident, pentru a putea elabora un model adecvat care să stabilească legătura de cauzalitate între curenții electrici transmembranari și potențialul de acțiune, acești curenți transmembranari trebuiau să fie măsurați selectiv, pe componente. Așa după cum este cunoscut și din cărți de fizică elementară, măsurarea unui curent electric printr-un conductor sau izolator nu comportă dificultăți majore: o sursă de tensiune (constantă sau variabilă) și un sistem de măsură al curentului electric (ampermetru analog sau digital) sunt suficiente! În cazul măsurării curenților electrici asociați cu

propagarea unui potenţial de acţiune, situaţia este mai complicată, deoarece diferenţa de potenţial transmembranar este variabilă şi deci curentul electric variabil măsurat ar reflecta şi modificările de conductanţă membranară pentru diferitele specii ionice implicate, şi modificările de diferenţă de potenţial. Un element suplimentar de dificultate era reprezentat şi de prezenţa componentei capacitive în curentul electric total măsurat. După cum este ştiut din fizica clasică, o diferenţă de potenţial variabilă în timp ($V_m(t)$), aplicată de o parte şi de alta a unui dielectric (C_m), dă naştere la apariţia unui curent electric – numit curent capacitiv.

$$I_c = C_m \frac{\partial V_m}{\partial t} \tag{219}$$

Astfel, valoarea totală a curentului electric măsurat ($I_m(t)$) este dată de relaţia:

$$I_m(t) = I_{ionic}(t) + I_c(t) = g_{Na}(t)\left[V_m(t) - V_{Na}\right] + g_K(t)\left[V_m(t) - V_K\right] + g_L(t)\left[V_m(t) - V_L\right] + I_c \tag{220}$$

Pentru a putea măsura proprietăţile de transport membranar asociate cu propagarea unui potenţial de acţiune, cei doi cercetători au înţeles că trebuia utilizată o nouă metodă electrofiziologică care să permită menţinerea nemodificată în timp a potenţialului de membrană. Evident, în acest caz, întregul context biofizic era modificat vizibil, întrucât nu se mai putea pune problema persistenţei potenţialului de acţiune în timpul măsurătorilor. Totuşi, prin evaluarea cantitativă a proprietăţilor de transport membranar la diferite valori discrete ale potenţialului de membrană, se puteau face deduceri cantitative despre relaţia de legătură între proprietăţile de transport ale biomembranelor şi diferenţa de potenţial la care aceste fenomene de transport au loc. Tehnica '*voltage-clamp*' a fost dezvoltată independent de către K. S. Cole (1949) şi G. Marmont (1949) şi ea permitea menţinerea unei diferenţe de potenţial dorită de experimentator de o parte şi de alta a membranei investigate.

Schema generală de funcţionare a unei astfel de instalaţii este prezentată mai jos:

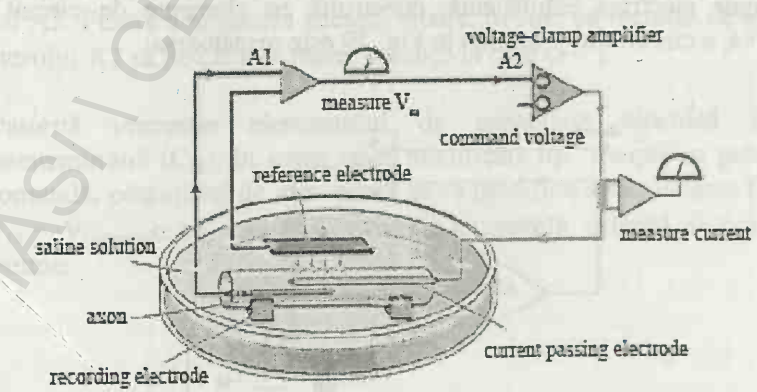


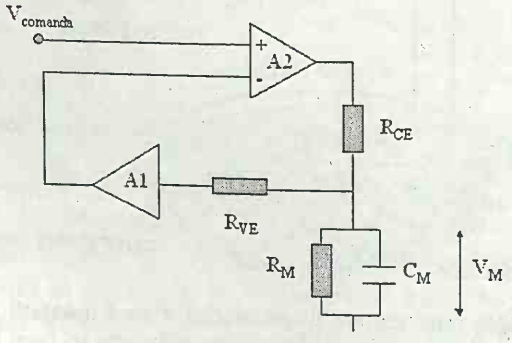
Figura 79 Cea mai simplă reprezentare diagramatică a unei instalaţii de măsură în condiţii de voltaj-fixat ('*voltage-clamp*') a curenţilor electrici transmembranari (vezi text) (adaptat din *www*).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După cum este figurat schematic mai sus (Fig. 79), diferența de potențial măsurată între mediul intern şi extern al celulei de studiu se face cu ajutorul unui electrod axial ('*recording electrode*') şi este comparată continuu cu o valoare menținută constantă ('*command voltage*'), prin intermediul circuitului operațional înglobat în amplificatorul propriu-zis (A2 – '*voltage-clamp amplifier*'). Prin intermediul acestui element de circuit, putem controla direct valoarea diferenței de potențial transmembranară (vezi proprietățile circuitelor integrate operaționale: diferența de potențial între intrările inversoare şi neinversoare ale unui astfel de circuit este nulă). Astfel, pentru a excita local celula de studiat, este suficient ca experimentatorul să modifice controlabil valoarea potențialului $V_{comanda}$ ('*command voltage*'). În cazul în care $V_{comanda}$ este astfel ales, încât să depolarizeze celula, prin membrana celulară se va stabili curentul ionic ($I_{ionic} = I_{ionic}$ (V, t)), ale cărui proprietăți urmează a fi descrise. Din considerente fizice elementare, trecerea unui curent ionic prin membrana celulară ar avea drept rezultat modificarea diferenței de potențial transmembranară, aşa cum se întâmplă în cazul în care potențialul este 'nefixat'. Consecința firească a acestei modificări de potențial transmembranar ar fi că diferența de potențial între intrările sale ar deveni diferită de zero. Prin construcție însă, circuitele integrate operaționale îşi modifică proprietățile la ieşire, astfel încât, printr-o buclă de feed-back, păstrează neschimbată diferența de potențial între cele două intrări şi egală cu zero. Cu alte cuvinte, elementul de circuit A2 va injecta în celulă un curent electric, prin intermediul unui alt electrod ('*current passing electrode*'), cu o asemenea cinetică, încât să compenseze exact curentul ionic care iese din celulă, şi deci diferența de potențial între mediul intra- şi extracelular să rămână neschimbată ($V_{comanda}$). Cu ajutorul unui alt circuit electronic se poate măsura astfel indirect curentul electric ionic ce se stabileşte prin membrana celulară, ca urmare a excitării sale electrice ('*measure current*').

Cu toate avantajele de utilizare ale acestei tehnici pentru măsurarea curenților relativ mari prin celule, există două inconveniente majore inerente, de care orice biofizician trebuie să fie conştient, pentru a le minimiza efectele în măsuratori de electrofiziologie celulară:

1. Schema electrică echivalentă, construită cu elemente de circuit active şi pasive, a circuitului prezentat în Fig. 79 este următoarea:



În această reprezentare, 'A2' este circuitul operaţional utilizat pentru compararea modificărilor diferenţei de potenţial transmembranar cu un potenţial de comandă, R_{CE} şi R_{VE} reprezintă electrozii de injecţie de curent electric în celula studiată '*current passing electrode*' şi, respectiv, de preluare a diferenţelor de potenţial celulare ('*recording electrode*'), R_M şi C_M se referă la rezistenţa electrică echivalentă şi capacitatea biomembranei, iar VM este diferenţa de potenţial transmembranar măsurată.

În acest caz, în urma unei analize de circuit – vezi informaţiile conţinute în capitolul 'Analiza schemei bloc a unui amplificator utilizat în măsurători tip '*patch-clamp*'') – se poate arăta că dacă potenţialul de membrană se stabileşte la valoarea ($V_{comanda}$), cu scopul de a modifica astfel potenţialul de membrană la aceeaşi valoare, ca şi $V_{comanda}$ pentru a crea condiţii particulare de măsurare a curenţilor electrici prin biomembrană în urma acestei modificări de diferenţă de potenţial transmembranar (aşa cum a fost arătat mai sus), căderea de potenţial *reală* pe biomembrană (V_M) este dată de relaţia:

$$\frac{V_M}{V_{comanda}} = \frac{GK}{GK+1} = \alpha \tag{221}$$

unde:

- $K = \dfrac{R_M}{R_M + R_{CE}}$
- G este factorul de amplificare al amplificatorului A2 (mai concret, '*open-loop gain*' – vezi capitolul 'Analiza schemei bloc a unui amplificator utilizat în măsurători tip '*patch-clamp*'');
- R_M, R_{CE}, R_{VE} sunt rezistenţele biomembranei, electrozilor '*current passing electrode*' şi '*recording electrode*', iar C_M este valoarea capacităţii biomembranei.

Se observă că, într-un asemenea circuit, în timpul măsurătorilor, biomembrana va fi supusă unei diferenţe de potenţial care va fi diferită de cea impusă din circuitul operaţional A2. Pentru a minimiza această eroare, trebuie ca factorul de amplificare al amplificatorului A2 să fie cât mai mare, condiţii în care $\alpha \sim 1$.

2. Datorită prezenţei elementului de capacitate electrică introdus de biomembrană (C_M), în urma unei modificări tip 'treaptă' a potenţialului de comandă, potenţialul de membrană se va modifica spre valoarea finală dată de $V_M = V_{comanda}\alpha$ cu o anumită evoluţie temporală, diferită de cea 'treaptă', şi anume:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$V_M(t) = \alpha V_{comanda}\left[1 - e^{-\frac{t}{\tau_0}}\right] \quad (222)$$

unde:

$$\tau_0 = \frac{R_M R_{CE} C_M}{(G+1)R_M + R_{CE}}$$

În aceste condiții, curentul electric măsurat prin circuit în cursul modificării diferenței de potențial transmembranar și care este dezvoltat independent de curenții ionici de interes este dat de:

$$I_M(t) = \frac{\alpha V_{comanda}}{R_M}\left[1 + \frac{\tau_M - \tau_0}{\tau_0} e^{-\frac{t}{\tau_0}}\right] \quad (223)$$

unde:

– τ_0 este definit ca mai sus
– $\tau_M = C_M R_M$

Prezența acestui curent membranar 'rezidual', datorat doar prezenței elementelor de circuit electronic din amplificatorul utilizat și a proprietăților electrice pasive biomembranare, poate perturba iremediabil studierea curentului ionic transmembranar. Astfel, dacă într-un experiment, variația temporală a curentului 'rezidual' este mult mai lentă decât cea a curentului ionic mediat de canalele ionice celulare, curentul 'rezidual' va estompa cvasicomplet curentul ionic de interes. În lipsa aplicării unor tehnici numerice sau utilizării unor echipamente electronice performante adecvate ce pot elimina în mare parte curentul 'rezidual', devine imposibilă analiza componentei de curent electric 'utilă' (ionică) prin celula studiată.

Tipic, rezultatele experimentale obținute în urma utilizării tehnicii '*voltage-clamp*' de măsurare a curentului electric total printr-o biomembrană excitabilă, arată astfel:

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

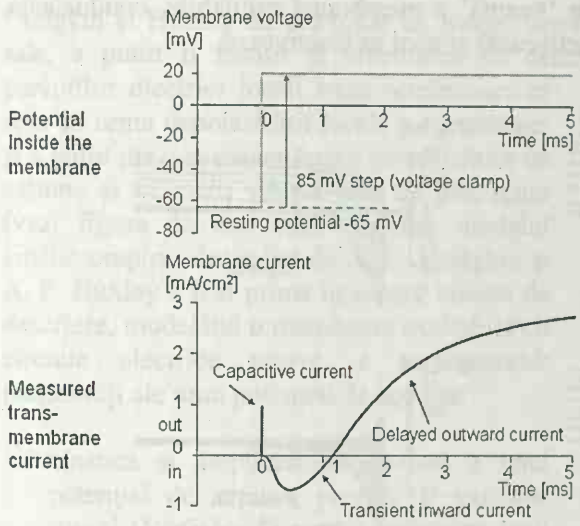


Figura 80 Variaţia temporală a curentului electric transmembranar ce se stabileşte printr-o celulă în condiţii de măsurătoare '*voltage-clamp*', când diferenţa de potenţial transmembranar este alterată de la o valoare iniţială de staţionaritate ('*resting potential*') la o valoare finală, menţinută constantă, de ~ 20 mV (adaptat din *www*).

După cum se observă din figura de mai sus (Fig. 80), în urma modificării tip 'treaptă' ('*step*') a diferenţei de potenţial transmembranar, curentul electric total măsurat conţine o componentă capacitivă ('*capacitive current*') şi o componentă ionică ('*inward*' şi '*outward current*'). Noţiunile de '*inward*' şi, respectiv, '*outward*' ce desemnează componentele curenţilor electrici ionici transmembranari se referă la sensul de 'curgere' al acestor componente: spre interiorul celulei şi, respectiv, exteriorul său. Dacă evoluţia temporală a componentei capacitive din curentul electric total poate fi relativ uşor eliminată din asemenea date experimentale, datorită cineticii sale mult mai rapide decât a componentei ionice, o sarcină dificilă rămâne separarea curentului electric ionic total în subcomponentele sale (mai ales, de sodiu şi potasiu). Una din cele mai elegante metode de separare a componentei ionice este cea farmacologică. Încă din anii '60, Narahashi şi Moore au arătat că tetrodotoxina (TTX), o toxină extrasă din peştele japonez fugu, blochează extrem de eficient difuzia pasivă a sodiului prin biomembrane; în anul 1972, Armstrong and Hille au demonstrat experimental că tetraetilamoniul (TEA) blochează, de asemenea, eficient difuzia pasivă a ionilor de potasiu prin biomembrane excitabile.

Prin blocarea selectivă şi succesivă a acestor componente ionice, Hodgkin şi Huxley au reuşit identificarea şi monitorizarea cineticii curenţilor electrici de sodiu şi potasiu ce se stabilesc printr-o membrană excitabilă, în urma unei depolarizări la o diferenţă de potenţial dată şi menţinută constantă. Astfel, cei doi cercetători au observat că în urma unei depolarizări tip treaptă ('*step*'), conductanţa biomembranei pentru ionii de sodiu (g_{Na}) creşte repede la o valoare maximală ('*peak*') şi apoi descreşte la o valoare apropiată de zero (se inactivează) (Fig. 81, panel d); conductanţa biomembranei pentru ionii de potasiu (g_K) se activează de aproape 10 ori mai încet decât g_{Na}, atingând o valoare maximală în aproximativ 10 ms, fără a se inactiva ulterior (Fig. 81, panel b). Prin prisma rezultatelor de mai sus, se poate aprecia că, spre deosebire de procesele cinetice ce guvernează difuzia transmembranară a ionilor de

potasiu, în urma unei depolarizări tip 'treaptă' a membranei excitabile, conductanța pentru ionii de sodiu (g_{Na}) crește (se activează) și apoi se inactivează.

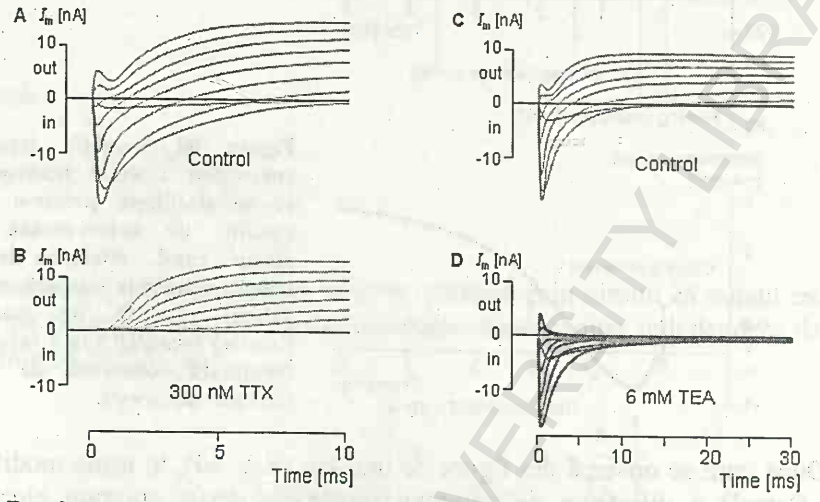


Figura 81 Rezultate experimentale derivate din măsurători în condiții de voltaj fixat ('*voltage clamp*') al curentului electric transmembranar printr-o membrană excitabilă stimulată supraliminal. (A) și (B) Curenții electrici măsurați în absența compusului farmacologic ce blochează specific calea de conducție ionică pentru sodiu (TTX) și în prezența acestei toxine (300 nM). Astfel, componenta de curent ionic rezidual măsurat în prezența TTX reprezintă doar contribuția difuziei ionilor de potasiu prin biomembrana excitată supraliminal. (C) și (D) Curenții electrici măsurați în absența compusului farmacologic ce blochează specific calea de conducție ionică pentru potasiu (TEA) și în prezența acestei toxine (6 mM). Componenta de curent ionic rezidual măsurat în prezența TEA reprezintă contribuția difuziei ionilor de sodiu prin biomembrana excitată supraliminal (adaptat din *www*).

Putem deci afirma că pentru transferul transmembranar al ionilor de sodiu, există două procese cinetice distincte care controlează variația în timp a conductanței biomembranei pentru acești ioni. Pentru a vizualiza predicția teoretică a formei dependenței de timp pentru diferența de potențial transmembranar, în urma unei depolarizari locale, Hodgkin și Huxley trebuiau să cunoască precis modul în care curentul ionic variază în timp și în funcție de diferența de potențial transmembranar. În acest scop, Hodgkin și Huxley au realizat o bază de date experimentale care să conțină informații despre dependența de potențial a curenților de sodiu și potasiu înregistrați în condiții de potențial fixat ('*voltage-clamp*'), la diferite valori ale potențialului de depolarizare. Scopul definit al lui Hodgkin și Huxley era să explice în termeni moleculari mecanismele cinetice ale activării și inactivării membranei excitabile de calmar pentru difuzia ionilor de sodiu și potasiu, precum și elucidarea mecanismului propagării potențialului de acțiune în membranele celulelor excitabile. După testarea intensivă a mai multor mecanisme capabile să răspundă la întrebările menționate mai sus, ei au trebuit să accepte concluzia că experimentele efectuate nu puteau promova și dovedi existența unui mecanism molecular unic, capabil să descrie riguros procesele cinetice și de difuzie ce caracterizează excitabilitatea membranară. În schimb,

Hodgkin şi Huxley au dezvoltat un model cinetic empiric, care în pofida simplităţii sale, a putut fi folosit în efectuarea de determinări cantitative ale proprietăţilor curenţilor electrici locali transmembranari ce apar în urma depolarizării locale a membranei şi a putut prezice corect forma potenţialelor de acţiune şi valoarea vitezei sale de propagare (vezi figura de mai sus). Succint, modelul cinetic empiric dezvoltat de A. L. Hodgkin şi A. F. Huxley a fost prima încercare reuşită de descriere, modelând o membrană excitabilă cu circuite electrice pasive, a următoarelor proprietăţi ale unui potenţial de acţiune:

- cinetica şi amplitudinea maximă a unui potenţial de acţiune, precum şi valoarea 'prag' ('*threshold*') pentru inducerea unui potenţial de acţiune în membrane excitabile;
- dependenţa de temperatură a mărimilor descrise mai sus;
- viteza de propagare a unui potenţial de acţiune;
- modificările temporale de impedanţă membranară în timpul propagării unui potenţial de acţiune;
- influxul ionilor de sodiu şi efluxul ionilor de potasiu prin membranele celulelor excitabile, în cursul unui potenţial de acţiune.

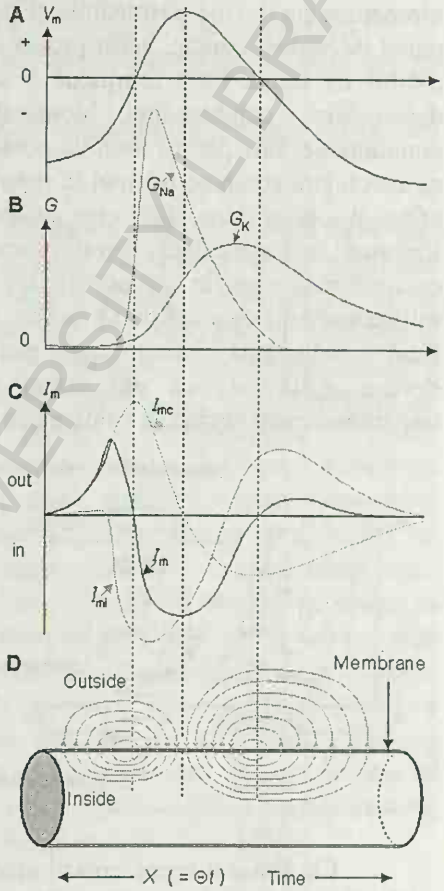


Figura 82 Evenimentele electrice şi de transport ionic transmembranar asociate cu propagarea unui potenţial de acţiune în membrane excitabile (vezi text) (adaptat din *www*).

Figura de mai sus (Fig. 82) ajută înţelegerea fenomenologică cât mai bună a mecanismelor de transport membranar şi a cineticii acestor fenomene de transport, asociate cu apariţia şi dezvoltarea unui potenţial de acţiune. Astfel, în urma aplicării unui puls excitator de depolarizare membranară, potenţialul de membrană se depolarizează, iar curentul electric asociat cu acest fenomen este mai ales cel capacitiv (I_{mc}). În această fază, conductanţa biomembranei pentru ionii de sodiu şi potasiu este însă extrem de redusă. Pe măsură ce membrana continuă să se depolarizeze, se atinge valoarea '*threshold*' a diferenţei de potenţial transmembranar, moment de la care se dezvoltă procesele de activare a transportului ionic pasiv de sodiu şi potasiu prin biomembrană (I_{mi}). Astfel, la începutul desfăşurării cinetice a acestor procese de activare de transport ionic transmembranar, conductanţa membranei pentru ionii de

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sodiu (G_{Na}) creşte dramatic; aceasta conduce la influxul sodiului în citosolul celulei respective, cauzând astfel depolarizarea continuă a biomembranei, iar după câteva milisecunde, potenţialul de membrană devine pozitiv. Din acest moment, biomembrana devine permeabilă şi pentru ionii de potasiu (G_K), cu observaţia că din punct de vedere cinetic, acest proces este mai lent decât cel ce caracterizează influxul ionilor de sodiu. Faza terminală a activării potenţialului de acţiune este iniţiată de descreşterea conductanţei biomembranei pentru ionii de sodiu şi creşterea conductanţei sale pentru ionii de potasiu; difuzia pasivă a ionilor de potasiu, în soluţia extracelulară conduce în final la repolarizarea celulei. Deoarece acest proces pasiv de eflux al ionilor de potasiu este caracterizat de o valoare a conductanţei pentru aceşti ioni mult mai mare decât cea din starea iniţială, de staţionaritate – şi în care celula era caracterizată electric de potenţialul de repaos – va exista un interval de câteva milisecunde în care celula va deveni hiperpolarizată în raport cu starea sa iniţială. În final, conductanţa biomembranei pentru ionii de potasiu se modifică în aşa fel încât devine egală cu cea din starea iniţială a celulei, iar diferenţa de potenţial transmembranar revine la valoarea ce caracterizează celula în acea stare de repaos.

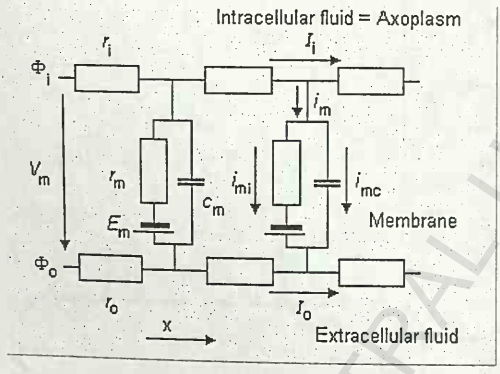


Figura 83 Reprezentarea electrică echivalentă a unei biomembrane excitabile. Semnificaţia fiziologică a elementelor pasive de circuit din această figură este discutată mai jos.

Cu ajutorul reprezentării electrice echivalente a unei biomembrane excitabile ca în figura de mai sus (Fig. 83), relaţia matematică esenţială ce stabileşte legătura între curentul electric total ce traversează biomembrana (I_m) şi diferenţa de potenţial transmembranar (V_m) este dată de următoarea ecuaţie diferenţială de ordinul doi, cu derivate parţiale, care se numeşte 'ecuaţia cablului':

$$I_m = I_{ionic} + C_m \frac{\partial V_m}{\partial t} = \frac{1}{R_i + R_o} \frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2} \qquad (224)$$

unde:

Ri – rezistenţa electrică a mediului intracelular, măsurată pe unitate de lungime (Ω/m);

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

R_o – rezistenţa electrică a mediului extracelular, măsurată pe unitate de lungime (Ω/m);

R_m – rezistenţa electrică a membranei (Ωm);

C_m – capacitatea electrică a membranei, măsurată pe unitate de lungime (F/m);

I_m – curentul electric ionic ce traversează biomembrana, măsurat pe unitate de lungime (A/m);

I_{ionic} – curentul electric total ce traversează biomembrana, măsurat pe unitate de lungime (A/m).

Hodgkin şi Huxley au rezolvat numeric ecuaţia cablului cu ajutorul unui calculator pentru operaţii aritmetice elementare (în acea perioadă nu erau dezvoltate computere şi software dedicate rezolvării accesibile a ecuaţiilor diferenţiale) şi au simulat grafic propagarea unui potenţial de acţiune. Succesul modelului lui Hodgkin şi Huxley în încercarea de a explica fenomenologic procesele de excitabilitate celulară a constituit un succes al metodelor biofizicii clasice; astfel, cei doi cercetători au demonstrat că fluxurile de ioni de sodiu şi potasiu prin membrana excitabilă constituiau substratul excitării electrice membranare şi al propagării unei perturbaţii electrice în lungul membranei, iar mecanismele propuse pentru a modela permeabilitatea ionică membranară voltaj-dependentă, împreună cu existenţa gradienţilor de concentraţie ionică transmembranară au putut explica rezonabil excitabilitatea electrică membranară. Cu tot succesul teoriei prezentate, Hodgkin şi Huxley au rămas în continuare foarte circumspecţi în legătură cu puterea modelului lor de a surprinde mecanismul real al excitabilităţii celulare. Ei au recunoscut întotdeauna că modelul cinetic prezentat de ei poate fi dezvoltat oricât de complicat, şi că nu trebuie privit ca reprezentarea ultimă a proceselor electrice din membranele excitabile: '*Certain features of our equations [are] capable of physical interpretation, but the success of our equations is no evidence în favor of the mechanism of permeability change that we tentatively had în mind when formulating them*' (Hodgkin şi Huxley, 1952)

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI \ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10 METODA '*PATCH-CLAMP*' DE STUDIERE A PROPRIETĂŢILOR FIZICE ALE CANALELOR IONICE, LA NIVEL DE SINGURĂ MOLECULĂ

Aşa după cum am subliniat într-un paragraf anterior, unul din rezultatele extrem de importante derivate din lucrările lui A. L. Hodgkin şi A. F. Huxley a fost cel privitor la căile separate de permeaţie membranară pentru ionii implicaţi în excitabilitatea celulară. Cu toate succesele modelului lor, cei doi cercetători nu au putut explica mulţumitor mecanismele moleculare membranare care erau implicate direct în transportul ionic transmembranar. Datorită proprietăţilor sale de izolator electric, o biomembrană trebuia să posede structuri macromoleculare intrinseci structurii sale lipidice, şi care să permită transferul de sarcini electrice dirijate, aşa cum era observat experimental. Hodgkin şi Huxley au propus încă din anul 1952 două ipoteze fundamentale care să explice rata mare de transfer ionic prin biomembrane: prezenţa în biomembrane a unor proteine '*carrier*' şi/sau a unor pori apoşi specializaţi în transferul ionic (canale ionice). Categoric, pentru a demonstra aceste ipoteze, era necesară o tehnică nouă care să permită înregistrarea în timp real a transportului ionic mediat de astfel de proteine membranare, a căror prezenţă era încă ipotetică. Primele înregistrări de curent electric mediate de canale ionice individuale au fost făcute de către cercetătorii germani B. Sakmann şi E. Neher în anii '70, care au utilizat o variantă tehnic-îmbunătăţită a tehnicii '*voltage-clamp*'. Astfel, în loc să măsoare activitatea electrică a unei celule excitabile prin penetrarea membranei celulare cu un microelectrod şi măsurarea cantităţii de interes (curent electric) de o parte şi de alta a biomembranei, Neher şi Sakmann au fabricat microelectrozi cu diametrul la vârf de până la 1 μm care au fost puşi în contact direct ('lipiţi') cu partea externă a unei biomembrane (Fig. 84). Astfel, în condiţii optime, se reuşea izolarea unei arii membranare de diametru redus, iar impedanţa contactului mecanic dintre vârful pipetei şi membrană era de ~ 50 GΩ.

În acest fel, cei doi cercetători au reuşit izolarea unei singure macromolecule din membrana respectivă implicată în transferul ionic, iar curentul electric mediat a fost măsurat utilizând tehnica tradiţională de '*voltage-clamp*'. În plus, prin aplicarea unei presiuni negative în electrodul de măsură – prin sucţiune – rezistenţa electrică a contactului electric dintre pipetă şi membrana celulară poate atinge valori de ordinul a sute de gigaohmi; astfel, se formează ceea ce în literatura de specialitate se numeşte

'*gigaseal*', caracterizat de curent electric rezidual extrem de mic şi care face posibilă înregistrarea curentului electric printr-un singur canal ionic aflat pe porţiunea de arie membranară de la vârful electrodului de măsură.

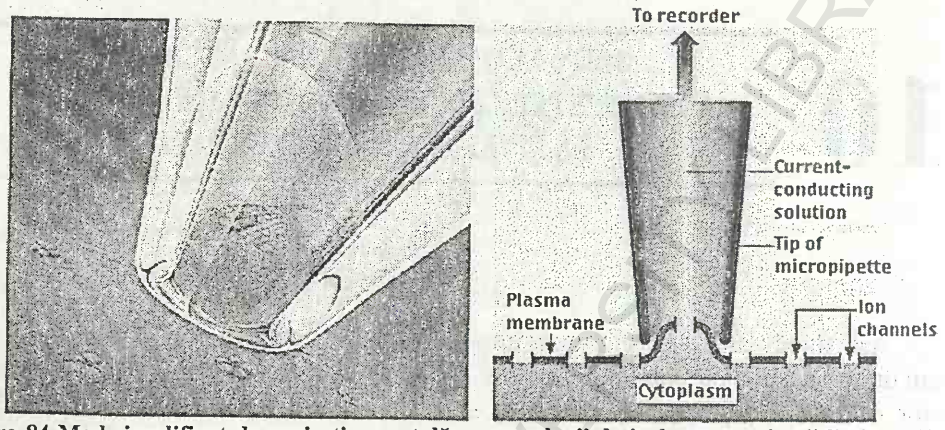


Figura 84 Mod simplificat de proiecţie mentală a procedurii de izolare a unei arii limitate dintr-o biomembrană ('*patch*') ce conţine doar un singur canal ionic (panelul din stânga). În panelul din dreapta este evidenţiat modul în care '*patch*'-ul membranar, izolat la vârful unui microelectrod specific realizat ('*tip of the microelectrode*'), şi care conţine un canal ionic ('*ion channel*'), este expus prin intermediul unei soluţii electrolitice ('*current-conducting solution*') într-un circuit de măsură al curentului electric mediat de acesta ('*recorder*') (adaptat din *www*).

Utilizând această metodă, Neher şi Sakmann au reuşit în 1976, pentru prima dată în lume, monitorizarea curentului electric mediat de receptorii nicotinici de acetilcolină din muşchiul striat de broască.

Figura 85 Fotografie ce surprinde dispunerea unui microelectrod utilizat în măsurători '*patch clamp*' (forma conoidă din dreapta) pe o celulă izolată dintr-un muşchi neted (adaptat din *www*).

Datorită faptului că un singur canal ionic conduce ~ 10 milioane de ioni pe secundă, corespunzători unui curent electric generat de doar câţiva picoamperi, principala dificultate tehnologică pentru echipa celor doi cercetători a fost de a elabora şi construi amplificatoare electronice cu zgomot termal, intrinsec extrem de redus. Curentul electric total înregistrat cu un setup de măsurători de tip '*patch-clamp*' are următoarele componente:

$$I_{total} = I_{channel} + I_{seal} + I_{electronics} \quad (225)$$

unde:

$I_{channel}$ este curentul electric mediat de canalul ionic (mărimea de interes direct în aceste măsurători);

I_{seal} este curentul electric de scurgere, prin rezistenţa electrică ('*seal*') constituită de mediul dintre vârful pipetei de '*patch-clamp*' şi biomembrană;

$I_{electronics}$ este un curent fluctuant, ce reprezintă zgomotul electric introdus de toate elementele pasive şi active din circuitul electronic (e.g., rezistenţa de feed-back a convertorului I-V, curentul '*bias*' al convertorului I-V etc.).

Ultimele două componente ale curentului electric total sunt surse majore de distorsionare a curentului electric prin canalul ionic. Elemente electronice performante de circuit pot contribui la minimizarea zgomotului electric intrinsec al amplificatorului folosit în aceste măsurători ($I_{electronics}$).

În tabelul de mai jos, sunt prezentate cele mai importante surse de zgomot electric (ce contribuie la apariţia componentei $I_{electronics}$) întâlnite în măsurători tip '*patch-clamp*' ($S_I(f) = 4kTRe\{Y(f)\}$) şi care trebuie minimizate în procesul de măsurare.

Tabel 7 Cele mai importante surse de zgomot electric întâlnite în măsurători tip '*patch-clamp*' ce afectează negativ calitatea înregistrării curenţilor tip '*single-channel*'.

DEPENDENŢA DE FRECVENŢĂ	TIPUL ZGOMOTULUI	ORIGINEA ZGOMOTULUI
$S_I \approx f^2$	Fluctuaţii de tensiune ('*voltage-noise*') şi de curent ('*curent-noise*') prin elemente pasive de circuit, capacitive	Fluctuaţii de tensiune a elementelor FET în conjuncţie cu capacitatea totală de la intrarea convertorului I-V Zgomotul prin elementele echivalente RC ale pipetei de '*patch-clamp*' Zgomotul prin elementele de circuit reprezentate de rezistenţa pipetei şi capacitatea '*patch*'-ului
S_I = const.	Fluctuaţii de tip 'Johnson'	Prin structura de legătură dintre pipetă şi membrană ('*seal*') şi porţiunea de membrană izolată de pipetă ('*patch*')
	Fluctuaţii de tip '*shot*'	Curentul de poartă FET Prin structura de legătură dintre pipetă şi membrană ('*seal*') şi porţiunea de membrană izolată de pipetă ('*patch*')
$S_I \approx 1/f^b$	Fluctuaţii de tip '*flicker*'	Prin suportul electrodului Prin pipetă, soluţie apoasă

BCU IAŞI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În ceea ce priveşte cealaltă componentă a curentului electric total (I_{scal}), ea poate fi minimizată odată cu realizarea optimă a izolării '*patch*'-ului de membrană ce conţine canalul ionic de interes, când valoarea rezistenţei de '*seal*' devine de ordinul gigaohmilor, iar curentul prin canalul ionic – $I_{channel}$ este mult mai mare în comparaţie cu acel curent electric rezidual, ce se scurge printre vârful pipetei şi suprafaţa celulei – I_{scal}. În acest caz, curentul electric total, în componenţa căruia intră acum, mai ales, curentul prin canalul ionic de studiat $I_{channel}$ măsurat la o diferenţă de potenţial menţinută constantă ($V_{command}$), este convertit în tensiune (circuitul A1), amplificat (circuitul A2), filtrat, digitizat şi apoi stocat în computer pentru analize ulterioare (Fig. 86).

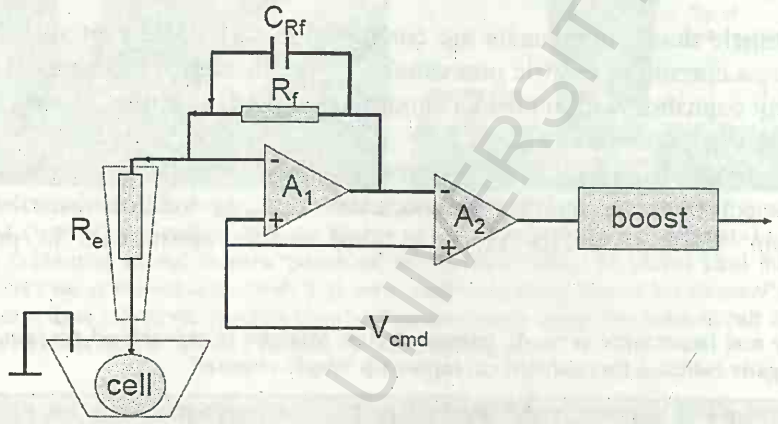


Figura 86 Schema bloc de construcţie a unui amplificator '*patch-clamp*' rezistiv. Curentul electric colectat prin intermediul electrodului de măsură (R_e) de pe un '*patch*' izolat de la celula studiată ('*cell*') şi care apare în circuit drept rezultat al aplicării unui potenţial electric de comandă (V_{cmd}), este, iniţial, convertit în tensiune de către amplificatorul operaţional A1 şi, ulterior, amplificat de către circuitul operaţional A2. Circuitul electronic figurat prin '*boost*' are rolul de a amplifica componentele spectrale înalte din semnalul de tensiune de la ieşirea lui A2, pentru a se compensa frecvenţa limitată de trecere a echipamentului cauzată de elementele de circuit (R_f, C_{Rf}) din bucla de feed-back a convertorului curent-tensiune A1.

După perioada de introducere a tehnicii '*patch-clamp*' lumii ştiinţifice, Fred Sigworth şi Owen Hamill au adus contribuţii esenţiale, mai ales, de ordin tehnologic, la îmbunătăţirea calitativă a acestei tehnici revoluţionare de măsurare în electrofiziologia moleculară, pentru care Neher şi Sakmann au primit premiul Nobel în anul 1991.

Tehnica '*patch-clamp*' de măsurare a curenţilor electrici mediaţi de proteine individuale prezintă marele avantaj că, în variante experimentale alese de către experimentator, este posibilă studierea unui canal ionic în diferite orientări topologice ce pot prezenta calităţi superioare, în condiţiile unor experimente particulare. Figura următoare (Fig. 87) prezintă toate cele patru variante majore ale tehnicii '*patch-clamp*': (a) varianta '*cell-attached*' (b) varianta '*whole-cell*' (c) varianta '*outside-out*' şi (d) varianta '*inside-out*'.

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

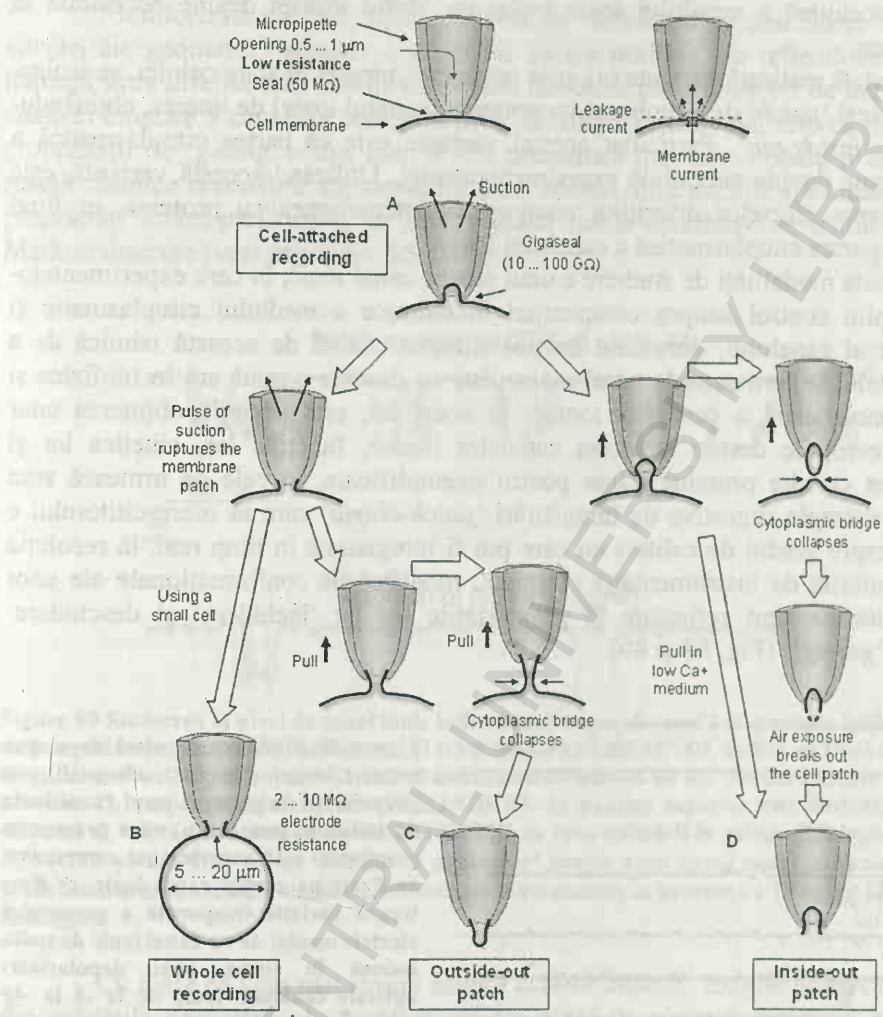


Figura 87 Diagrama comprehensivă a celor patru variante majore ale tehnicii '*patch-clamp*': (a) varianta '*cell-attached*', (b) varianta '*whole-cell*', (c) varianta '*outside-out*' și (d) varianta '*inside-out*' (vezi text pentru detalii) (adaptat din *www*).

Fără a intra în detalii experimentale, descrierea comprehensivă a acestor variante experimentale este:

a. '*cell – attached*' – în urma aplicării presiunii negative în interiorul pipetei de '*patch-clamp*', se izolează o porțiune de membrană ce conține canalul ionic de interes, și se studiază în condițiile în care el rămâne ca parte componentă a celulei.

b. dacă din varianta (a) se continuă aplicarea presiunii negative în pipetă, se obține varianta '*whole – cell*'. În acest mod, se poate măsura curentul electric membranar total, cu avantajul posibilității de a modifica compoziția biochimică a mediului citoplasmatic în mod controlabil.

c. dacă odată obținută varianta (b) se retrage pipeta de '*patch-clamp*' în mediul extracelular, se realizează configurația '*outside-out*'. În această configurație,

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

partea extracelulară a canalului ionic izolat pe vârful pipetei devine accesibilă în mediul extern.

d. odată realizată varianta (a), prin retragerea pipetei în afara celulei, se izolează complet acel '*patch*' de membrană cu proteina (canalul ionic) de interes, obținându-se varianta '*inside-out*'. Particular acestei variante este că partea citoplasmatică a canalului ionic devine accesibilă experimentatorului. Utilizând această variantă, este facilă studierea efectelor diferiților compuși la interacțiunea cu proteina, ei fiind aplicați din partea citoplasmatică a canalului ionic.

Aceste modalități de studiere a unui singur canal ionic, în care experimentatorul are deplin control asupra compoziției biochimice a mediului citoplasmatic și extracelular al canalului, coroborat cu posibilitatea oferită de această tehnică de a studia efectele de permeație la nivel molecular, au deschis o nouă eră în biofizica și fiziologia moleculară a canalelor ionice. În acest fel, este posibilă obținerea unor informații esențiale despre structura canalelor ionice, funcțiile lor, cinetica lor și interacțiunea cu alte proteine. Doar pentru exemplificare, în cele ce urmează sunt prezentate exemple sugestive de înregistrări '*patch-clamp*' care să ofere cititorului o impresie despre gradul de calitate cu care pot fi înregistrate în timp real, la rezoluția temporală oferită de instrumentația existentă, modificările conformaționale ale unor canale ionice ce sunt reflectate în proprietățile lor de 'închidere' și deschidere' succesivă ('*gating*') (Fig. 88 și 89).

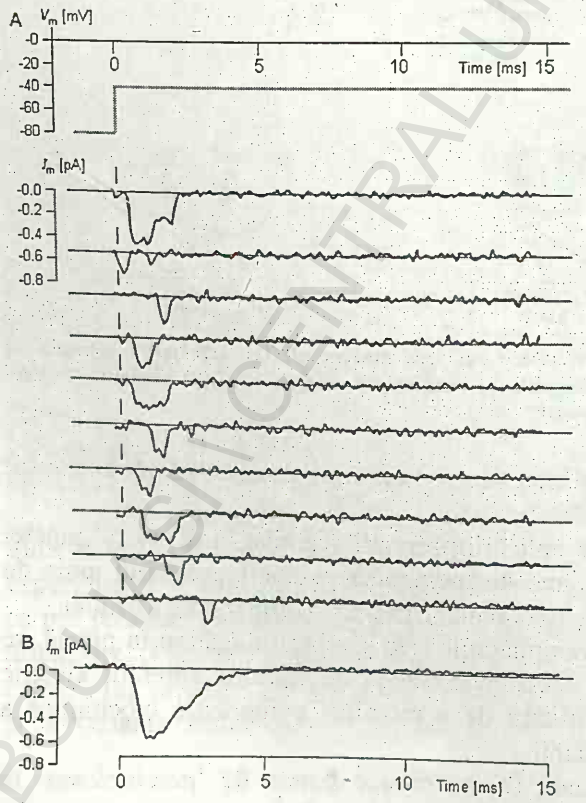


Figura 88 Studierea la nivel de singur canal ionic ('*single channel*') a proprietății de gating a unui canal ionic de sodiu. În panelul (a) sunt prezentate rezultatele a 10 experimente consecutive realizate pe același canal ionic, ce ilustrează variația temporală a curentului electric mediat de un canal ionic de sodiu indusă în urma unei depolarizări aplicate canalului ionic de la -8 la -40 mV. În panelul (b) este prezentat rezultatul mediерii a 352 de experimente consecutive de tipul celor arătate anterior și exprimă rezultate ce s-ar obține prin înregistrări de curent electric mediate de mai multe canale ionice simultan (măsurători macroscopice '*voltage-clamp*' – vezi paragrafele anterioare). După cum se remarcă din aceste date, proprietatea macroscopică a inactivării canalelor ionice de sodiu este rezultatul proprietăților cinetice distincte ('*gating*') ale acestei proteine exprimate de persistența ei într-o stare de tip 'închis', imediat după activarea sa voltaj-dependentă.

Monitorizate electric, aceste procese de 'închidere' și deschidere' cauzate de alterări ale geometriei spațiale a canalelor ionice studiate, nu reflectă altceva decât tranziții între diferite stări conductive. Unul din conceptele deosebit de importante ale analizei cinetice a canalelor ionice la nivel de singură moleculă, este că manifestarea proprietății de '*gating*' – așa cum a fost prezentată mai sus – poate fi asimilată cu reacții chimice reversibile ale canalului ionic studiat între diferite stări moleculare, cu proprietăți fizice particulare, ce sunt caracterizabile cantitativ de teoria proceselor Markov discrete (vezi expresiile 95-104).

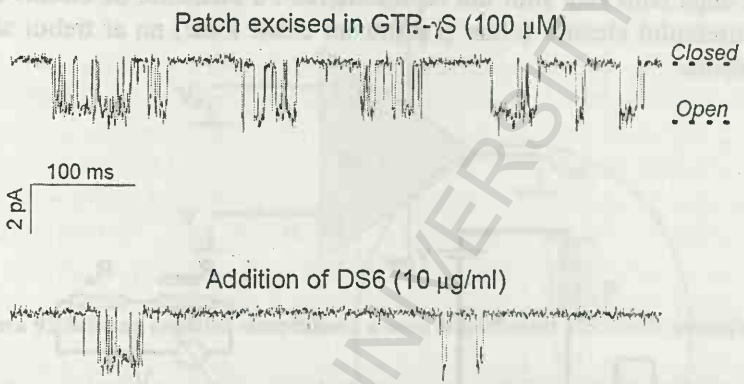


Figura 89 Studierea la nivel de canal ionic individual ('*single channel*') al efectului inhibitor produs de o peptidă compusă din 17 aminoacizi (TRMEGNLPAKLRKMNSD, notată cu DS6) de la capătul terminal carboxil al subunității GIRK1 al unui canal de potasiu de tip '*inward-rectifier*' modulat de proteina G, asupra canalului ionic GIRK1/GIRK5. În panelul superior este ilustrată activitatea electrică (i = i(t)) a canalului ionic GIRK1/GIRK5 în lipsa aplicării în soluția fiziologică a peptidei DS6 (GTP-γS are doar rol de 'stimulator molecular' pentru acest canal ionic), iar panelul inferior arată modificările exclusiv cinetice ale canalului ionic studiat, în prezența a 10 μg/ml DS6 în soluția fiziologică.

Cu toate că vom mai reveni asupra acestor aspecte, trebuie remarcată aici una din calitățile exclusive ale monitorizării la nivel de singură moleculă a activității electrice a canalelor ionice. Din inspecția vizuală a Fig. 89, devine lipsit de dubiu faptul că acel caracter inhibitor al interacțiunii dintre un compus chimic specific – notat cu DS6 – și canalul de potasiu de tip '*inward-rectifier*' modulat de proteina G (GIRK1/GIRK5), are drept substrat molecular alterarea cineticii acestui canal ionic, și nu a proprietăților sale de transport electric. În prezența a 10 μg/ml DS6, este vizibilă alterarea duratelor în care canalul ionic studiat se află în starea conductivă ('*open*'), pe când amplitudinea curentului electric mediat de acest canal ionic în această stare este neafectată de interacțiunea sa cu peptida DS6. Astfel, dacă experimentul prezentat succint de Fig. 89 ar fi fost realizat pe o colecție mare de canale ionice când s-ar fi măsurat valoarea medie a curentului electric mediat de acestea, acțiunea peptidei DS6 ar fi fost vizualizată ca o alterare temporală a acelui curent electric mediu; așa după cum vom prezenta în capitolele următoare (vezi formula 294), chiar și pentru cele mai simple diagrame cinetice, variația curentului electric mediu prin 'N' canale ionice

reflectă atât posibile alterări cinetice ale lor, cât şi modificări ale proprietăţilor de transport ale acestora. Cum am exemplificat mai sus, tehnologia '*patch-clamp*' poate oferi informaţii esenţiale şi directe despre modurile de acţiune, la nivel molecular, dintre diferiţi factori fizici sau chimici şi canalele ionice.

10.1 Analiza schemei bloc a unui amplificator utilizat în măsurători tip '*patch-clamp*'

Aşa după cum este ştiut din reprezentarea cu elemente de circuit elementare, măsurarea curentului electric (chiar şi printr-un canal ionic) nu ar trebui să comporte dificultăţi majore.

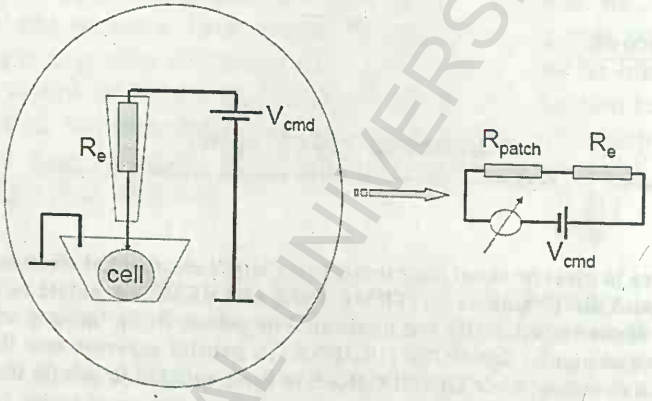


Figura 90 Schema electrică simplificată, echivalentă, a modelului fizic de măsurare a curentului electric printr-o celulă; în această reprezentare, R_e este rezistenţa electrică echivalentă a electrodului de măsură şi a soluţiei electrolitice externe, iar R_{patch} este rezistenţa electrică echivalentă a porţiunii de membrană studiată.

În figura de mai sus (Fig. 90), este reprezentată schema electrică simplificată, echivalentă, a modelului fizic de măsurare a curentului electric printr-o celulă. Astfel, la aplicarea unei diferenţe de potenţial din exterior (V_{cmd}), instrumentul indicator de măsură al curentului electric va indica o valoare dată teoretic de legea lui Ohm:

$$I = \frac{V_{cmd}}{R_{patch} + R_e} \qquad (226)$$

Pe lângă problemele ridicate de prezenţa rezistenţei de acces totală R_e – electrod + soluţia fiziologică –, care conduce la o diminuare a curentului electric de interes prin membrana studiată ce se consideră că are rezistenţa echivalentă R_{patch}, unul din punctele foarte slabe ale circuitului de măsură de mai sus este că nu permite realizarea stării fizice de '*voltage-clamp*' (vezi paragrafele anterioare). Una din cele

BUCUREŞTI UNIVERSITY LIBRARY

mai elegante soluţii tehnice pentru a diminua problemele de mai sus a fost dată de utilizarea circuitelor integrate operaţionale pentru măsurarea curentului electric prin biomembrane.

Noţiunea de amplificator operaţional a apărut în anii '40 şi definea un amplificator special construit care putea fi configurat să efectueze o multitudine de operaţii matematice doar prin configurarea inteligentă a componentelor sale externe, pasive. În termeni simpli, schema bloc şi principalele caracteristici ale unui amplificator operaţional sunt prezentate mai jos (Fig. 91).

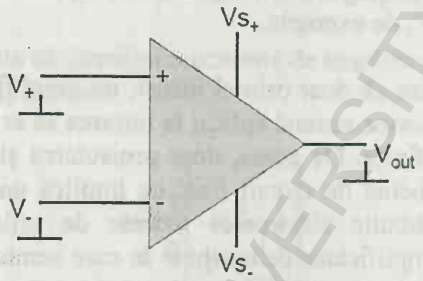


Figura 91 Schema electrică simplificată a unui amplificator electronic operaţional.

Pentru curiozitate, este prezentată, în continuare, schema constructivă detaliată a unui amplificator operaţional (Fig. 92); deşi simplificată, schema bloc de principiu a oricărui amplificator operaţional cuprinde trei etaje esenţiale:

- etajul de intrare ('*input stage*'), care este conceput să amplifice diferenţa de potenţial dintre intrarea neinversoare ('+') şi inversoare ('-') a amplificatorului;
- etajul intermediar ('*second stage*'), care amplifică suplimentar semnalul ce provine de la etajul de intrare;
- etajul final ('*output stage*'), la ieşirea căruia se culege semnalul final, amplificat, de la ieşirea amplificatorului (V_{out}).

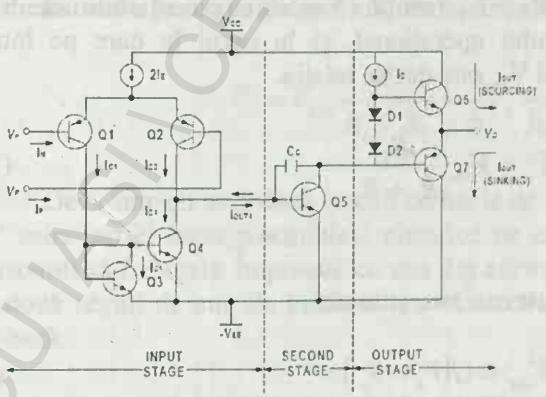


Figura 92 Schema electrică constructivă a unui amplificator electronic operaţional, reprezentat simplificat în figura precedentă.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Analiza funcțională simplificată a unui amplificator operațional utilizează patru presupuneri fundamentale, care idealizează, în fond, schema sa electronică:

- amplificarea sa (G) în lipsa oricăror elemente de feed-back externă ('*open-loop gain*'), și definită de raportul între (V_{out}) și ($V_+ - V_-$) este infinită;
- impedanța de intrare este infinită; altfel spus, în intrările neinversoare ('+') și inversoare ('-') ale amplificatorului nu intră curenți electrici;
- impedanța de ieșire este nulă;
- banda de trecere a amplificatorului ('*bandwidth*') este infinită; altfel spus, un asemenea amplificator răspunde instantaneu la aplicarea unui semnal oricât de rapid – de tip 'Heaviside', de exemplu.

Este astfel evident că doar prin el însuși, un amplificator operațional nu este extrem de util, deoarece orice semnal aplicat la intrarea sa ar rezulta într-un semnal de ieșire cu amplitudine infinită. De aceea, doar proiectarea și utilizarea unor bucle de feed-back externe în schema de circuit final ce implică un amplificator operațional poate da naștere la circuite electronice extrem de utile. Pentru exemplificare, prezentăm mai jos un amplificator de tensiune în care semnalul de intrare se dispune între intrarea neinversoare a circuitului operațional și masă.

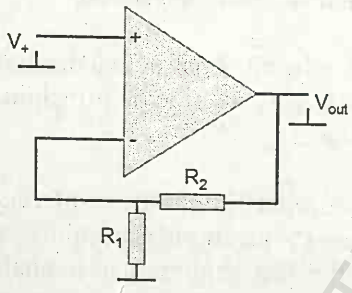


Figura 93 Schema electrică constructivă a unui amplificator de tensiune în care semnalul de intrare se dispune între intrarea neinversoare a circuitului operațional și masă.

În urma aplicării legilor elementare ale circuitelor electrice pentru bucla de feed-back constituită din rezistorii R_1 și R_2, rezultă că valoarea potențialului electric pe intrarea inversoare ('-') a circuitului operațional, și în cazul în care pe intrarea neinversoare este aplicat potențialul V_+, este dat de relația:

$$V_- = V_{out}\frac{R_1}{R_1 + R_2} \tag{227}$$

Dar, din presupunerile făcute mai sus, știm că:

$$V_{out} = G(V_+ - V_-) \tag{228}$$

Din combinarea acestor două relații, rezultă:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$V_{out} = \frac{1}{b}\left(\frac{1}{1+\frac{1}{Gb}}\right)V_+$$

$$b = \frac{R_1}{R_1 + R_2} \tag{229}$$

Acest rezultat arată că circuitul electronic de amplificare prezentat mai sus are factorul de amplificare (A) dat de:

$$A = \frac{1}{b}\left(\frac{1}{1+\frac{1}{Gb}}\right) \tag{230}$$

Deoarece polaritatea semnalelor de ieşire şi intrare este aceeaşi, amplificatorul prezentat mai sus se numeşte 'ne-inversor'. Factorul de amplificare 'A', rezultat în prezenţa elementelor de feed-back externe, se numeşte '*close-loop gain*'. Trebuie să facem aici o observaţie extrem de importantă pentru analizele de circuit ulterioare: dacă amplificarea în bucla deschisă a circuitului operaţional ('*open-loop gain*') este extrem de mare ($\sim \infty$), rezultă că:

$$V_{out} = \frac{1}{b}V_+ \tag{231}$$

iar prin înlocuire în relaţia de mai sus, se determină că:

$$V_- = V_{out}\frac{R_1}{R_1 + R_2} = \frac{1}{b}V_+\frac{R_1}{R_1 + R_2} = V_+ \tag{232}$$

Deci, într-un asemenea circuit cu buclă de feed-back, circuitul operaţional 'va face' orice astfel încât potenţialele electrice pe cele două intrări (inversoare şi ne-inversoare) să fie egale. Împreună cu una din afirmaţiile făcute mai sus, definim astfel cele două reguli de aur ale oricărui circuit electronic operaţional ideal, cu buclă de feed-back:

- curenţii de intrare pe cele două intrări ale circuitului operaţional sunt nuli;
- potenţialele electrice pe cele două intrări sunt egale.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aceste două reguli sunt fundamentale pentru orice analiză de circuit ce conține amplificatoare operaționale, și vor fi utilizate în descrierea modului de funcționare al unui amplificator utilizat în măsurători de tip '*patch-clamp*'.

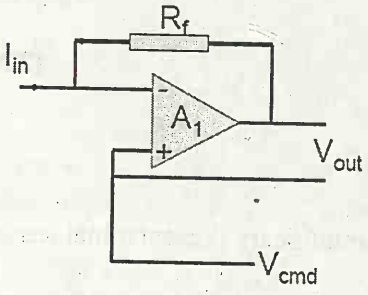


Figura 94 Schema electrică constructivă a unui convertor curent – tensiune rezistiv utilizat în înregistrări electrice de tip '*patch-clamp*' (vezi text pentru detalii).

Un considerent tehnologic esențial utilizat în construcția unui amplificator de tip '*patch-clamp*' este că măsurarea curentului electric de interes (I_{in}) se face indirect; astfel, acest curent electric este, inițial, convertit într-un semnal de tensiune, care este ulterior amplificat, iar citirea curentului electric măsurat se face printr-o operație de conversie algebrică. Din analiza matematică a circuitului, prezentă mai sus (Fig. 94), și având în vedere regulile prezentate până acum de analiză a unui circuit operațional, rezultă că, în urma aplicării unei tensiuni electrice între intrarea neinversoare și masă (V_{cmd}), aceeași tensiune va fi prezentă între intrarea inversoare și masă. Această tensiune va fi deci aplicată, indirect, de o parte și de alta a membranei biologice studiate, și în condiții optime se va genera un curent electric ce trebuie măsurat și analizat ulterior (I_{in}). Diferența de potențial electric măsurată între terminalul de ieșire al amplificatorului operațional și intrarea sa ne-inversoare va fi dată de relația simplă:

$$V_{out} = -I_{in}R_f \tag{233}$$

Prin amplificarea ulterioară a acestui semnal și scalarea sa corespunzătoare, se poate deci deduce valoarea curentului electric măsurat prin membrana biologică în condiții de '*voltage-clamp*'; această afirmație este adevărată, deoarece prin construcția sa și principiile de funcționare, potențialul de pe intrarea inversoare a circuitului operațional va fi menținut egal cu cel de pe intrarea neinversoare (V_{cmd}). O altă concluzie interesantă, dedusă din analiza circuitului de mai sus este că pentru a măsura curenți electrici cât mai mici, valoarea rezistenței electrice a rezistorului din bucla de feed-back (R_f) trebuie să fie cât mai mare. În același timp, însă, utilizând rezistori prea mari, se poate ajunge la fenomenul de saturare electrică a amplificatorului. De exemplu, pentru un circuit operațional alimentat de la o sursă de tensiune de 10 V, utilizarea unui rezistor de feed-back de 50 GΩ limitează curentul electric maxim, măsurabil, la 200 pA. În aceste condiții, dacă în cursul măsurătorilor se întâmplă ca prin biomembrană să apară curenți electrici mai mari decât 200 pA, ei nu vor fi măsurabili de circuit. În acest scop, se poate apela la utilizarea inter-schimbabilă a

unor rezistori de feed-back cu valori mai mici, care să mărească domeniul dinamic al amplificatorului. Din punct de vedere tehnologic, însă, utilizarea unor valori prea mici pentru rezistența electrică a rezistorului din bucla de feed-back contribuie la înrăutățirea caracteristicilor de zgomot electric ('*noise*') – aşa după cum vom prezenta în capitolele următoare. Pe scurt doar, amplitudinea fluctuațiilor termale de curent electric prin rezistorul de feed-back depinde invers proporțional cu valoarea rezistenței sale electrice; pentru valori prea mici ale acestui rezistor, chiar dacă domeniul dinamic al amplificatorului este optimizat, amplitudinea fluctuațiilor termale de curent electric intrinseci lui pot să depăşească valorile curentului electric de măsură, acesta din urmă devenind indiscernabil. Soluția cea mai benefică în acest sens este utilizarea unui circuit operațional ce conține în bucla de feed-back un capacitor electric în locul rezistorului şi al cărui zgomot termic este extrem de redus (Fig. 95).

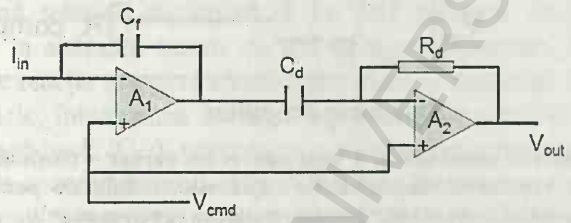


Figura 95 Schema electrică constructivă a unui convertor curent – tensiune capacitiv utilizat în înregistrări electrice de tip '*patch-clamp*'.

Deoarece circuitul operațional A_1 ce are în bucla de feed-back un capacitor se comportă ca un integrator, pentru ca la ieşirea sistemului electronic să măsurăm un semnal direct proporțional cu semnalul de la intrare (I_{in}), mai este necesar un etaj suplimentar (A_2), care, cuplat printr-un alt capacitor (C_d) de ieşirea primului etaj, are rolul de a diferenția semnalul integrat de primul etaj. Astfel, valoarea semnalului corectat la ieşirea sistemului prezentat mai sus este:

$$V_{out} = R_d \frac{C_d}{C_f} I_{in} \tag{234}$$

Nu trebuie uitat de menționat existența a două aspecte tehnice ce pot deveni extrem de problematice pentru un amplificator de '*patch-clamp*'. Astfel, datorită rezistenței electrice finite a microelectrodului de '*patch-clamp*' ('R_s') care este cuplat în serie cu canalul ionic studiat, potențialul electric la vârful microelectrodului (V_m) şi care este 'simțit' de canalul ionic izolat, va fi mai mic decât cel aplicat din exterior (V_{cmd}). Pentru compensarea acestui fenomen ('*series resistance compensation*') se utilizează în practică un amplificator operațional sumator ('*summing amplifier*') care permite aplicarea pe microelectrod a sumei dintre potențialul de comandă şi un potențial compensator, care să compenseze căderea de tensiune existentă pe microelectrod (Fig. 96). Altfel spus, dacă pe microelectrod căderea de tensiune ar fi de 5 mV, iar experimentatorul doreşte să studieze activitatea unui canal ionic la un

potențial ('V_{cmd}') de 50 mV, valoarea rezistenței de compensare ('*R_s compensation*') se va regla în așa fel, încât potențialul total aplicat pe microelectrod să fie egal cu '5 mV + V_{cmd}'; astfel, valoarea potențialului la vârful microelectrodului va fi de 50 mV.

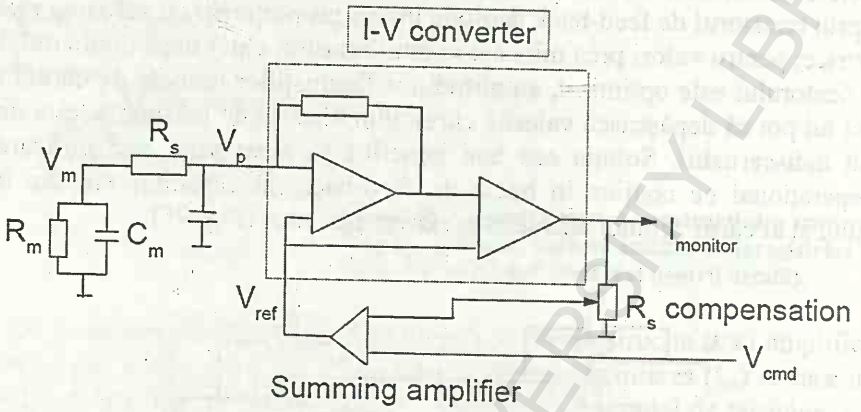


Figura 96 Schema electrică constructivă a unui convertor curent – tensiune rezistiv ce permite compensarea externă a rezistenței electrice finite a microelectrodului de '*patch-clamp*' ('R_s'), care este cuplat în serie cu canalul ionic studiat ('*series resistance compensation*').

O altă problemă tehnică se referă la faptul că, datorită prezenței elementului de capacitate electrică introdus de biomembrană (C_M) și microelectrod (reprezentat echivalent ca C_p), în urma unei modificări de tip 'treaptă' a potențialului de comandă, potențialul de membrană se va modifica spre valoarea finală cu o anumită evoluție temporală, diferită de cea 'treaptă'. Astfel, își va face simțită prezența în circuit un curent electric capacitiv, dezvoltat în cursul modificării diferenței de potențial transmembranar și care se suprapune peste curenții ionici de interes.

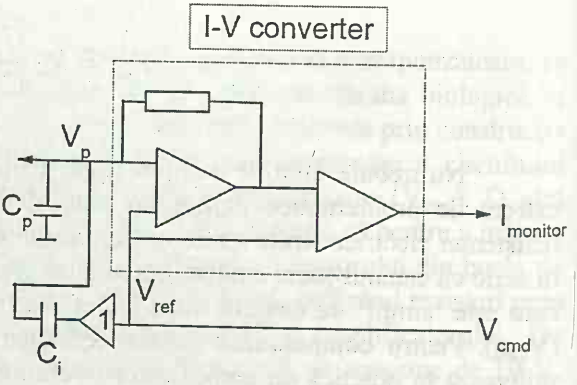


Figura 97 Schema electrică constructivă a unui convertor curent – tensiune rezistiv ce permite compensarea externă a curentului electric capacitiv ce apare drept rezultat al prezenței elementului de capacitate electrică introdus de biomembrană și microelectrod (reprezentat echivalent ca C_p).

Pentru a compensa într-o măsură cât mai mare persistența cinetică a acestui curent capacitiv, ce poate să estompeze cinetica acelui curent electric de interes, mediat de canalul ionic studiat, se utilizează un circuit electronic ca de mai sus (Fig. 97). Astfel, în momentul în care se aplică un potențial tip 'treaptă' (V_{cmd}), prin

intermediul circuitului '1' şi a capacitorului variabil C_i, se va injecta în vârful microelectrodului de măsură un curent capacitiv, ales astfel încât să aibă cinetica cât mai apropiată şi amplitudine opusă curentului capacitiv determinat de C_p. În mod ideal, cei doi curenţi electrici astfel configuraţi se vor anula reciproc, iar convertorul I-V va prelua doar componenta ionică a curentului electric total.

10.2 Analiza funcţiei de transfer a unui circuit de conversie curent-tensiune

Spre deosebire de situaţia idealizată prezentată mai sus, cu privire la reprezentarea echivalentă a unui convertor curent-tensiune utilizat în experimente de tip '*patch-clamp*', viaţa reală poate fi cu mult mai dificilă pentru experimentator. Astfel, o problemă tehnică suplimentară ce este inerentă convertoarelor curent-tensiune se referă la alterarea benzii de trecere a convertorului de către elementele pasive din bucla de reacţie negativă (feed-back). Este de subliniat, în acest sens, că din punct de vedere fizic, întotdeauna există o componentă capacitivă 'parazită' asociată cu rezistorul de feed-back (C_{Rf}), precum şi o altă componentă capacitivă prezentă la intrarea inversoare a convertorului (Fig. 98). Aşa după cum vom arată în cele ce urmează, componenta capacitivă parazită din bucla de feed-back se dovedeşte a fi utilă, pentru că favorizează funcţionarea convertorului în regim liniar. Componenta capacitivă prezentă la intrarea inversoare a convertorului provine, mai ales, de la componentele electronice din primul etaj constructiv al circuitului operaţional A_1, asociate suplimentar cu acele componente capacitive ale electrodului de măsură a curentului electric.

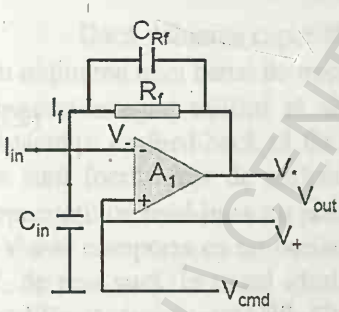


Figura 98 Schema electrică constructivă a unui convertor curent – tensiune rezistiv care, într-un context real, posedă o componentă capacitivă 'parazită' asociată cu rezistorul de feed-back (C_{Rf}), precum şi o altă componentă capacitivă prezentă la intrarea inversoare a convertorului.

Ţinând cont de regulile elementare ce guvernează funcţionarea unui circuit operaţional, şi de faptul că în realitate orice amplificator operaţional are o bandă de trecere foarte mare, dar finită, putem scrie următoarea ecuaţie pentru conservarea sarcinii electrice în bucla de feed-back:

$$I_f = I_{R_f} + I_{C_{Rf}} = \frac{V_* - V_-}{R_f} + C_{Rf}\frac{\partial(V_* - V_-)}{\partial t} \qquad (235)$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Răspunsul finit al amplificatorului operațional la aplicarea unor semnale pe cele două intrări este exprimat astfel:

$$\frac{\partial(V_* - V_+)}{\partial t} = \omega_A (V_+ - V_-) \tag{236}$$

unde $\omega_A(s^{-1})$ este o mărime care caracterizează viteza de răspuns a amplificatorului operațional.

Pe de altă parte, legea de conservare a sarcinii electrice în nodul de rețea de pe intrarea inversoare a amplificatorului se scrie astfel :

$$I_f = I_{in} + C_{in} \frac{\partial V_-}{\partial t} \tag{237}$$

Printr-un artificiu matematic şi cu ajutorul relațiilor de mai sus, putem scrie următoarea relație de compunere a componentelor curentului electric în nodul de rețea de pe intrarea inversoare a amplificatorului:

$$\frac{1}{R_f}(V_* - V_+ + V_+ - V_-) + C_{Rf} \frac{\partial(V_* - V_+ + V_+ - V_-)}{\partial t} = I_{in} + C_{in} \frac{\partial V_-}{\partial t} \tag{238}$$

Utilizând notațiile:

$$\begin{aligned} V_{out} &= V_* - V_+ \\ C_t &= C_{in} + C_{Rf} \end{aligned} \tag{239}$$

relația de mai sus devine:

$$\frac{V_{out}}{R_f} + \frac{\partial V_{out}}{\partial t} \frac{1}{\omega_A R_f} + C_{Rf} \frac{\partial V_{out}}{\partial t} + \frac{C_t}{\omega_A} \frac{\partial^2 V_{out}}{\partial t^2} = I_{in} \tag{240}$$

Soluția acestei ecuații diferențiale liniare de ordinul doi exprimă legătura cauzală esențială dintre mărimea de intrare de la bornele convertorului curent-tensiune (I_m) şi mărimea de la ieşirea convertorului (V_{out}).

BUIASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În coordonate complexe, funcţia de transfer a unui convertor I-V (aşa cum este prezentat în Fig. 98) când semnalul de la intrarea convertorului este de tip 'treaptă' (Heaviside), este dată de relaţia:

$$T(\omega) = \frac{V_{out}(\omega)}{I_m(\omega)} = \frac{1}{\tau_0^2 (j\omega)^2 + 2\tau_0 (j\omega)\zeta + 1} \qquad (241)$$

unde:

- $\tau_0 = (\tau_{convertor} R_f C_t)^{\frac{1}{2}}$
- $\zeta = \frac{1}{2} \frac{\tau_{convertor} + R_f C_{Rf}}{(\tau_{convertor} R_f C_t)^{\frac{1}{2}}}$
- $\tau_{convertor}$ este constanta de timp a amplificatorului operaţional I-V $\left(\omega_A = \frac{2\pi}{\tau_{convertor}}\right)$
- C_t este valoarea capacităţii totale de la intrarea circuitului operaţional folosit pentru conversia I-V ($C_t = C_{In} + C_{Rf}$);
- C_{In} este capacitatea electrică echivalentă a elementelor electrice pasive de la intrarea convertorului (e.g., pipeta de '*patch-clamp*', membrana biologică).

Dacă valoarea capacităţii totale este de ordinul a 10 pF, se poate estima că pentru obţinerea unei benzi de trecere a convertorului de 10 kHz (τ_o = 16 μs) este necesar ca circuitul integrat utilizat să aibă constanta de timp $\tau_{convertor} = 2.6 \times 10^{-9}$ s, iar valoarea capacităţii de feed-back să fie menţinută în jurul valorii de 3.2×10^{-15} F! Aceste condiţii nu sunt foarte uşor de realizat experimental. Suplimentar, trebuie reţinut că valoarea capacităţii de feed-back nu poate fi micşorată arbitrar oricât ($\zeta < 1$), deoarece convertorul I-V s-ar comporta ca un oscilator (vezi formula funcţiei de transfer al unui convertor I-V, de mai sus). În cazul ideal, pentru un circuit integrat dat, valoarea lui C_{Rf} poate fi modificată (micşorată) până când $\zeta = 1$ (convertorul I-V este amortizat critic). În figurile următoare (Fig. 99, 100) sunt reprezentate în unităţi relative soluţiile numerice ale ecuaţiei 241, date de funcţia de transfer a unui sistem I-V, aşa cum a fost reprezentat mai sus, precum şi variaţia temporală a semnalului de la ieşirea convertorului, atunci când semnalul de la intrarea sa (I_p) este de tip 'treaptă' (Heaviside).

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

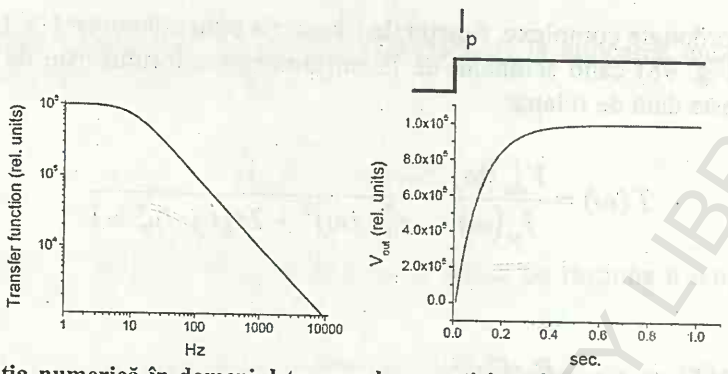


Figura 99 Soluția numerică în domeniul temporal a ecuației ce descrie dinamica unui convertor curent – tensiune rezistiv real, în cazul în care valorile componentelor electrice sunt astfel, alese încât convertorul se comportă ca un sistem liniar critic amortizat (panelul din partea dreaptă); în panelul din partea stângă este reprezentată funcția de transfer a acestui convertor, în condițiile enunțate.

În condițiile fizice în care valorile componentelor electrice sunt astfel alese, încât convertorul se comportă ca un sistem liniar critic amortizat, se remarcă banda de trecere limitată a sistemului şi reflectarea acestei trăsături în variația lentă, 'non-treaptă' a mărimii de ieşire.

Dacă valoarea capacității de feed-back este micşorată arbitrar, cu scopul de a mări banda de trecere a convertorului, se observă din figura de mai sus (Fig. 100) apariția unui domeniu spectral caracteristic fenomenului de rezonanță, fapt ce reflectă comportamentul de oscilator al convertorului curent-tensiune.

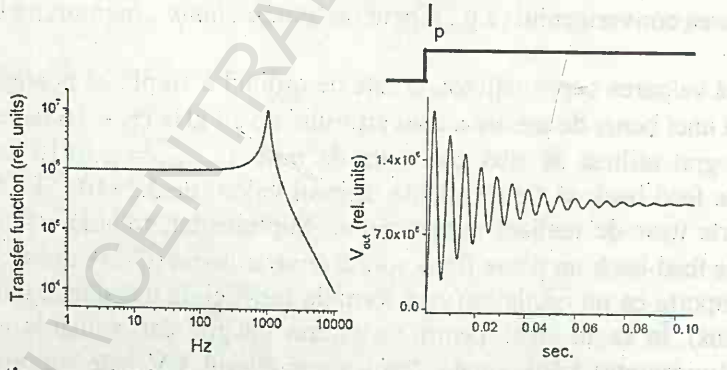


Figura 100 Soluția numerică în domeniul temporal a ecuației ce descrie dinamica unui convertor curent – tensiune rezistiv real, în cazul în care valorile componentelor electrice sunt astfel alese, încât convertorul se comportă ca un oscilator (panelul din partea dreaptă); în panelul din partea stângă este reprezentată funcția de transfer a acestui convertor, în condițiile enunțate.

Astfel, la stimularea convertorului cu un semnal tip 'treaptă' (I_p), mărimea de ieşire are o variație periodic-amortizată, fapt ce este detrimental procesului de conversie curent-tensiune. Pentru a construi convertoare I – V cu benzi de trecere suficient de mari, încât să permită înregistrarea curenților tip '*patch-clamp*' în condiții spectrale optime, se alege un C_{Rf} suficient de mare, încât $\zeta > 1$ şi în etajele următoare

BUMF CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

se utilizează elemente electronice speciale pentru îmbunătăţirea benzii de trecere a convertorului I-V (*'frequency-boosters'*).

10.3 Analiza de zgomot electric a unui convertor curent-tensiune

Într-un paragraf anterior, am prezentat succint cele mai importante surse de zgomot electric întâlnite în măsurători de tip *'patch-clamp'* ce afectează negativ calitatea înregistrării curenţilor tip *'single-channel'*. În cele ce urmează, ne vom referi exclusiv la două categorii de zgomot electric ce contribuie substanţial la diminuarea calităţilor funcţionale ale unui convertor curent-tensiune: (a) zgomotul electric intrinsec al unui circuit operaţional şi (b) zgomotul electric termal asociat cu electrodul de preluare a curentului electric şi membrana celulară studiată. Din punct de vedere fizic, zgomotul termal se datorează mişcării browniene a purtătorilor de sarcină din orice conductor, iar manifestarea electrică a acestui fenomen este dată de valori fluctuante ale diferenţei de potenţial electric de la bornele oricărui conductor, chiar şi în condiţii de echilibru, în care curentul electric net prin acel conductor este nul. În literatura de specialitate, acest tip de zgomot electric se mai numeşte zgomot 'Johnson' sau 'Nyquist'. Pentru un rezistor real, caracterizat (şi) de prezenţa acestui tip de zgomot electric, există două reprezentări fizice echivalente ale sale: cea a unui rezistor ideal (nezgomotos) cuplat în serie cu o sursă de tensiune fluctuantă, sau în paralel, cu o sursă de curent cu valoare, de asemenea, fluctuantă.

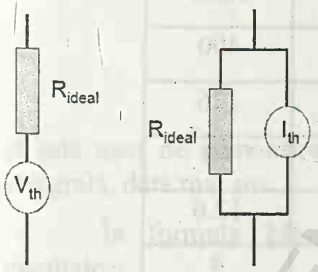


Figura 101 Reprezentarea echivalentă a unui rezistor real, căruia îi este caracteristic existenţa unor fluctuaţii de tensiune electrică la capetele sale în condiţii de echilibru – zgomot electric termal – ca un rezistor ideal (nezgomotos) cuplat în serie cu o sursă de tensiune fluctuantă (V_{th}) sau în paralel cu o sursă de curent (I_{th}) cu valoare, de asemenea, fluctuantă.

În particular, pentru un rezistor aşa cum este reprezentat mai sus, există o legătură simplă între densitatea de putere spectrală a fluctuaţiilor de tensiune şi de curent electric ale surselor de tensiune şi, respectiv, de curent, din diagramele echivalente prezentate în Fig. 101:

$$S_{V_{th}}(f) = 4kTR$$
$$S_{I_{th}}(f) = \frac{4kT}{R} \qquad (242)$$

unde k este constanta lui Boltzmann şi T este temperatura absolută la care se află conductorul studiat.

Acum putem înțelege mai facil afirmațiile făcute anterior în legătură cu acel compromis ce trebuie realizat în ceea ce privește valoarea rezistenței din bucla de feed-back a unui convertor I-V: o rezistență electrică redusă în bucla de feed-back garantează un domeniu dinamic mai generos pentru convertor, dar, în același timp, produce fluctuații termale de curent electric mai mari, ce pot interfera dramatic cu mărimea de interes. În cazul general al unui sistem electric pasiv complex ce conține și capacitori, și/sau bobine, caracterizat de valoarea impedanței (Z) echivalente, ecuațiile de mai sus se scriu astfel:

$$S_V(f) = 4kT\,\mathrm{Re}(Z(f)) \tag{243}$$

$$S_I(f) = \frac{4kT}{\mathrm{Re}(Z(f))} \tag{244}$$

Tabel 8 Valori exemplificative pentru caracteristicile fluctuațiilor termale de tensiune și curent electric ce sunt prezente în rezistori cu valori variabile, pentru valori diferite ale domeniului spectral de măsură (*'root mean square'* = r.m.s. = deviația standard a acestor fluctuații).

	1 kHz μV r.m.s	10 kHz μV r.m.s	1 kHz pA r.m.s	10 kHz pA r.m.s
100 Ω	0.04	0.126	400	1260
1 kΩ	0.126	0.4	126	400
10 kΩ	0.4	1.26	40	126
100 kΩ	1.26	4	12.6	40
1 MΩ	4	12.6	4	12.6
10 MΩ	12.6	40	1.26	4
100 MΩ	40	126	0.4	1.26
1 GΩ	126	400	0.126	0.4
10 GΩ	400	1260	0.04	0.126
100 GΩ	1260	4000	0.013	0.06

Înainte de a detalia conținutul acestui capitol, vom revedea câteva definiții și rezultate esențiale din analiza semnalelor. Așa după cum am precizat și într-un capitol anterior – pentru claritate, aici doar reamintim acel formalism – în cazul general, orice funcție neperiodică (f(t)) poate fi descompusă Fourier cu ajutorul următoarelor formule:

BCU ASSOCIATED UNIVERSITY LIBRARY

$$f(t)=\frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{\infty}F(\omega)e^{j\omega t}d\omega$$

$$F(\omega)=\int_{-\infty}^{\infty}f(t)e^{-j\omega t}dt \qquad (245)$$

În formulele de mai sus F(ω), se numeşte integrala Fourier a semnalului f(t) şi exprimă reprezentarea în coordonate de frecvenţă a semnalului temporal considerat. Un rezultat interesant se referă la echivalenţa dintre puterea medie a unui semnal (f(t)), exprimat în coordonate temporale şi de frecvenţă:

$$\lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\int_{-\infty}^{\infty}(f(t))^2=\lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\int_{-\infty}^{\infty}|F(\omega)|^2d\omega \qquad (246)$$

Egalitatea de mai sus este o formulare alternativă a teoremei lui Parseval ce subliniază egalitatea dintre energia totală a unui semnal exprimat în coordonate temporale sau de frecvenţă:

$$\int_{-\infty}^{\infty}|f(t)|^2=\int_{-\infty}^{\infty}|F(\omega)|^2d\omega \qquad (247)$$

şi este uşor de demonstrat dacă ţinem seama de formula de descompunere Fourier integrală, dată mai sus.

În formula 246, prin analogie cu exprimarea din domeniul temporal, cantitatea:

$$S(\omega)=\lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}|F(\omega)|^2 \qquad (248)$$

se numeşte densitate de putere spectrală ('*power spectrum density*'), şi are semnificaţia densităţii de putere din semnalul considerat pe unitate de frecvenţă.

O altă funcţie deosebit de utilă în analiza semnalelor este funcţia de autocorelaţie (R(τ)):

$$R(\tau)=\lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\int_{-\frac{T}{2}}^{\frac{T}{2}}f(t)f(t+\tau)dt \qquad (249)$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru semnalul considerat, funcția de autocorelație exprimă gradul mediu de asemănare dintre semnalul f(t) măsurat la timpul (t) și el însuși, măsurat la un timp ulterior (t+τ) și are următoarele proprietăți:

$$\begin{aligned} &R(-\tau)=R(\tau) \\ &R(0)\geq R(\tau),\tau\in(0,\infty) \\ &\sigma^2=R(0) \end{aligned} \tag{250}$$

(σ^2 este varianța semnalului considerat, iar a 3-a egalitate este adevărată pentru cazul simplificat în care presupunem că valoarea medie a semnalului în discuție este nulă).

Un rezultat utilizat pe larg, mai ales, în analiza semnalelor stochastice este așa-numita teoremă Wiener-Khintchine, valabilă pentru semnale staționare (deterministe sau stochastice):

$$S(\omega)=\int_{-\infty}^{\infty}R(\tau)e^{-j\omega\tau}d\tau \tag{251}$$

Ținând cont de proprietatea de paritate a funcțiilor de autocorelație și de densitate de putere spectrală:

$$\begin{aligned} &R(-\tau)=R(\tau) \\ &S(-\omega)=S(\omega) \end{aligned} \tag{252}$$

putem scrie:

$$S(\omega)=4\int_{0}^{\infty}R(\tau)\cos(\omega\tau)d\tau \tag{253}$$

Utilizând relația (246), se poate demonstra ușor că pentru semnale stochastice, staționare și ergotice, cu valoare medie nulă, relația de legătură între varianța fluctuațiilor semnalului (σ^2) și funcția de densitate de putere spectrală este dată de relația:

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} S(\omega)d\omega \tag{254}$$

Din punct de vedere practic, condiţia de 'valoare nulă' pentru media unui semnal stochastic, staţionar şi ergotic se poate îndeplini dacă din semnalul original, cu valoare nenulă a valorii medii, scădem valoarea sa medie, ce este întotdeauna uşor calculabilă.

Deoarece analiza semnalelor în sistemele biofizice se face, mai ales, în condiţiile în care aceste sisteme sunt presupuse a fi liniare, vom face, în cele ce urmează, câteva referiri la proprietăţile importante ale acestora.

Astfel, sistemul '*black-box*' arătat în panelul (a) din Fig. 102 este liniar, dacă pentru orice semnal aplicat la intrare sa (x), semnalul de la ieşire (y = f(x)) are următoarele proprietăţi :

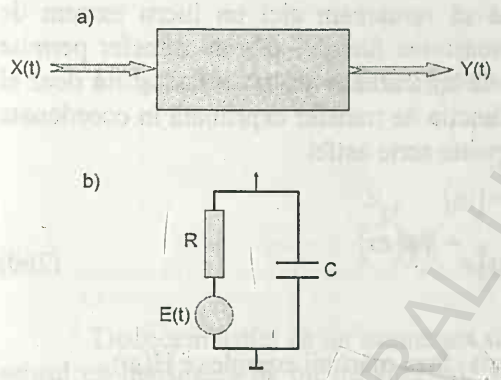


Figura 102 (a) Reprezentarea simbolică a unui sistem fizic liniar, pentru care relaţiile dintre semnalul aplicat la intrarea sa (X(t)) şi semnalul rezultat (Y(t)) sunt date de formulele 265. (b) Exemplu tipic de sistem electric liniar, pentru care mărimea de intrare este dată de sursa de tensiune E(t), iar semnalul de la ieşirea sistemului este măsurat între simbolul 'săgeată' şi masă (vezi text).

$$\begin{aligned} f(x_1 + x_2) &= f(x_1) + f(x_2) \\ f(cx) &= cf(x) \end{aligned} \tag{255}$$

Dacă răspunsul sistemului liniar considerat la aplicarea unui semnal de tip 'funcţie delta' la intrarea sa este dat de funcţia H(t), legătura dintre semnalul de ieşire al sistemului liniar (Y(t)) şi orice semnal aplicat la intrare (X(t)) este dată de expresia de mai jos, numită integrală de convoluţie :

$$Y(t) = \int_{-\infty}^{\infty} H(\tau)X(t-\tau)d\tau \tag{256}$$

Funcţia H(τ) se mai numeşte funcţie de transfer exprimată în coordonate temporale, şi pentru un sistem fizic-realizabil şi stabil, ea trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$H(\tau)=0;\tau<0 \tag{257}$$

$$\int_{-\infty}^{\infty}|H(\tau)|d\tau<\infty \tag{258}$$

(pentru orice semnal mărginit aplicat la intrare, răspunsul sistemului este, la rândul lui, mărginit).

Dacă aplicăm formulele de transformare Fourier pentru integrala de convoluție scrisă mai sus, obținem:

$$Y(\omega)=H(\omega)X(\omega) \tag{259}$$

Această expresie dă legătura, în coordonate de frecvență, între răspunsul sistemului liniar considerat la aplicarea unui stimul, cunoscând reprezentarea spectrală a funcției sale de transfer (H(ω)). Trebuie să remarcăm aici un lucru extrem de interesant: pentru un sistem fizic liniar, cunoaşterea funcției sale de transfer permite deducerea răspunsului analitic al sistemului la aplicarea oricărui stimul, şi nu doar al unuia de tip 'funcție delta'. Ținând cont că funcția de transfer exprimată în coordonate de frecvență este o mărime complexă, ea se poate scrie astfel:

$$H(\omega)=|H(\omega)|e^{-j\phi(\omega)} \tag{260}$$

unde s-au separat modulul şi, respectiv, faza mărimii complexe H(ω).

În această exprimare, modulul şi, respectiv, faza funcției de transfer complexe au semnificații simple şi intuitive; astfel, dacă la intrarea sistemului liniar am aplica un semnal sinusoidal, cu o amplitudine oarecare, modulul funcției de transfer ($|H(\omega)|$) reprezintă raportul dintre amplitudinea semnalului sinusoidal de la ieşirea sistemului şi amplitudinea semnalului aplicat. Similar, defazajul între semnalul sinusoidal de ieşire şi cel de intrare este dat de factorul de fază (Φ(ω)); printr-o conversie adecvată din unități unghiulare în unități temporale, putem astfel determina întârzierea cu care apare semnalul de la ieşirea sistemului liniar considerat Y(t), în raport cu momentul inițial, când am aplicat la intrarea sa semnalul X(t). Ca o aplicație interesantă şi simplă a noțiunilor prezentate mai sus, vom face o analiză de semnal pentru un circuit electric simplu prezentat în Fig. 102, panelul b. Astfel, dacă în respectivul circuit există o sursă de tensiune E(t), iar scopul analizei este de a determina răspunsul sistemului măsurat la bornele capacitorului C, putem scrie:

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$I = C\frac{\partial V_{out}}{\partial t} = \frac{E - V_{out}}{R}$$
$$E = V_{out} + RC\frac{\partial V_{out}}{\partial t} \tag{261}$$

unde I este curentul total măsurat în circuitul considerat, iar V_{out} este semnalul de tensiune măsurat la bornele capacitorului.

Aplicând formula de transformare Fourier pentru ecuaţiile de mai sus, rescrierea lor în coordonate de frecvenţă se face echivalent astfel:

$$V_{out}(\omega) = \frac{E(\omega)}{1 + j\omega RC} \tag{262}$$

Utilizând relaţia de definire a densităţii de putere spectrală, putem scrie:

$$S_{V_{out}}(\omega) = \frac{S_E(\omega)}{1 + (\omega RC)^2} \tag{263}$$

Deducem astfel că un asemenea sistem se comportă ca un filtru 'trece-jos', în sensul că densitatea de putere spectrală pentru componentele spectrale cu frecvenţe mari ce compun semnalul iniţial (E(t)) sunt atenuate în raport cu acele componente spectrale ce au frecvenţe mai mici.

O altă aplicaţie interesantă a noţiunilor prezentate anterior se referă la deducerea funcţiei de transfer şi, în particular, a impedanţei sau admitanţei pentru un sistem biologic. Dacă putem considera un sistem biologic ca având comportament liniar, şi dacă din reprezentarea sa electrică echivalentă este de interes cunoaşterea impedanţei sale, se poate utiliza cunoscuta rescriere a legii lui Ohm în coordonată de frecvenţă:

$$I(\omega) = \frac{V(\omega)}{Z(\omega)} \tag{264}$$

În ecuaţia de mai sus, I(ω) şi V(ω) sunt transformările Fourier integrale ale semnalelor de curent electric ce apar în acel sistem (I(t)), ca urmare a aplicării unui potenţial oarecare (V(t)); Z(ω) este tot o mărime complexă, şi este reprezentarea

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fourier a impedanței sistemului considerat. Din relația de definire a densității de putere spectrală, relația de mai sus devine:

$$S_I(\omega)=\frac{S_V(\omega)}{|Z(\omega)|^2} \tag{265}$$

Astfel, pentru determinarea experimentală a impedanței sistemului considerat în coordonata de frecvență, este suficient să aplicăm la intrarea sistemului un semnal simplu de tensiune ce are descompunerea integrală Fourier cunoscută. Făcând raportul dintre densitatea (cunoscută) de putere spectrală a semnalului aplicat ($S_V(\omega)$) şi densitatea (măsurată) de putere spectrală a semnalului rezultat ($S_I(\omega)$), putem deduce uşor impedanța sistemului în coordonata de frecvență.

Un alt concept important pe care îl vom utiliza în cele ce urmează este că pentru semnale electrice necorelate, densitatea de putere spectrală a sumei semnalelor este tocmai suma densităților de putere spectrală a fiecărui semnal în parte.

Astfel, dacă pentru sistemul simplu figurat mai jos:

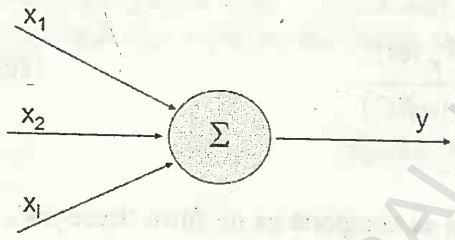


Figura 103 Reprezentarea simbolică a unui sistem fizic liniar ce realizează operația de sumare a unor semnalele necorelate aplicate la intrare (X_1, X_2,... X_j), rezultând, astfel, la ieşirea sa, semnalul Y.

funcția de cros-corelare dintre oricare două semnale de la intrare (x_j şi x_k) este nulă (adică semnalele respective sunt total necorelate):

$$R_{x_j x_k}=\lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\int_0^T x_j(t)x_k(t+\tau)dt=0 \tag{266}$$

semnalul sumat de la ieşirea sistemului (y) are densitatea de putere spectrală dată de:

$$S_y(\omega)=\sum_{i=1}^{n}S_{x_i}(\omega) \tag{267}$$

unde:

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

$$y(t)=\sum_{i=1}^{n} x_i(t) \qquad (268)$$

Cu aceste noţiuni, devine relativ simplu să facem analiza de zgomot electric a unui convertor I-V rezistiv, utilizat în măsurători de '*patch-clamp*'. Din această perspectivă, trebuie să subliniem că un circuit operaţional real este caracterizat (şi) de două mărimi esenţiale pentru analiza noastră, denumite '*input offset current*' şi '*input offset voltage*'. Aceste mărimi reflectă abaterile de la situaţia ideală în care am abordat un circuit operaţional în paragrafele precedente, şi au de-a face cu imperfecţiunile inerente de construcţie a dispozitivelor electronice semiconductoare. Astfel, '*input offset current*' reprezintă curentul electric total care circulă între intrările amplificatorului în condiţii de echilibru, iar '*input offset voltage*' reprezintă diferenţa de potenţial ce trebuie aplicată între intrările amplificatorului operaţional pentru a obţine o valoare nulă la ieşirea sa. Altfel spus, chiar şi când ambele intrări ale circuitului se află la acelaşi potenţial electric, la ieşirea sa, vom putea măsura un potenţial diferit de zero.

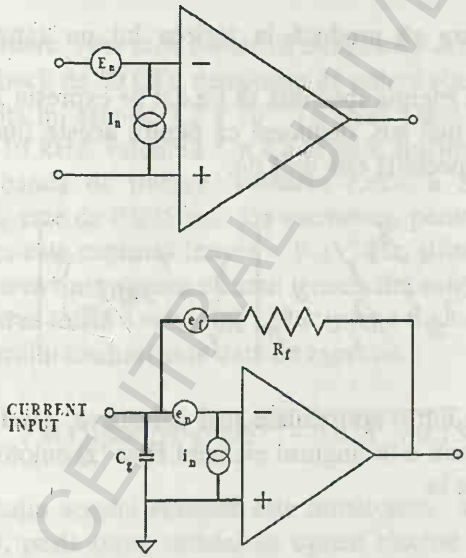


Figura 104 Reprezentarea simbolică a unui circuit operaţional real ce este caracterizat de mărimile '*input offset current*' (I_s) şi '*input offset voltage*' (E_n), dispuse în circuit aşa cum este indicat.

Cu aceste precizări, reprezentarea electrică echivalentă a unui circuit operaţional este aşa cum se vede în figura de mai sus (Fig. 104, panelul de sus).

Dacă utilizăm un asemenea circuit operaţional pentru construcţia unui convertor curent-tensiune, reprezentarea sa echivalentă este ca în figura de mai sus (panelul inferior). În această figură, C_g se referă la valoarea echivalentă a capacităţii electrice intrinseci ce este măsurată între intrarea inversoare a amplificatorului şi masă, compusă din contribuţia elementelor semiconductoare JFET de la intrarea amplificatorului, precum şi a capacităţii parazite din bucla de feed-back; montajul serie R_f – e_f nu este

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

altceva decât reprezentarea electrică echivalentă a rezistorului din bucla de feed-back, din punct de vedere al proprietăților sale de zgomot termal (vezi mai sus, în text). În termeni de densitate de putere spectrală a fluctuațiilor de tensiune măsurate la ieșirea amplificatorului operațional, prin utilizarea mărimilor definite anterior și considerând sursele de zgomot termal – e_n, i_n, e_f – ca fiind necorelate, putem scrie:

$$S_V^{out}(f)=S_{i_n}R_f^2+S_{e_f}+S_{e_n}\left[1+\left(2\pi fR_fC_g\right)^2\right] \tag{269}$$

unde S_{in}, S_{cf}, S_{cn} reprezintă densitățile de putere spectrală a fluctuațiilor cauzate de '*input offset current*', a fluctuațiilor termale de diferență de potențial electric la bornele rezistorului de feed-back și a fluctuațiilor cauzate de '*input offset voltage*'.

Pentru analiza noastră, poate fi mai util dacă reprezentăm acest rezultat altfel: care ar trebui să fie puterea spectrală a fluctuațiilor de curent electric de la intrarea convertorului $\left(S_I^{in}(f)\right)$, care să producă la ieșirea lui un semnal de tensiune fluctuant, al cărui densitate de energie spectrală să fie dat de expresia 269 ?

Utilizând relațiile de mai sus, deducem că pentru aceste fluctuații de curent electric, densitatea de putere spectrală este dată de:

$$S_I^{in}(f)=S_{i_n}+\frac{S_{e_f}}{R_f^2}+S_{e_n}\left[\frac{1}{R_f^2}+\left(2\pi fC_g\right)^2\right] \tag{270}$$

Trebuie menționat că într-o aproximare mai permisivă, când presupunem că rezistorul din bucla de feed-back este singurul element fizic 'zgomotos' din convertor, rezultatul de mai sus se reduce la:

$$S_I^{in}(f)=\frac{S_{e_f}}{R_f^2}=\frac{4kT}{R_f} \tag{271}$$

În general, S_{in}, S_{cf}, S_{cn} sunt funcții dependente de frecvență; dacă facem însă aproximația grosieră că ele ar fi constante, prin integrarea relației de mai sus între frecvența 0 și o limită superioară, stabilită, de obicei, de experimentator (notată simbolic cu B), obținem că valoarea varianței fluctuațiilor de curent electric ce există la intrarea amplificatorului real considerat, și care provin din sursele amintite, este dată de:

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\left(\sigma_I^{in}\right)^2 = \int_0^B \left[S_{in} + \frac{S_{ef}}{R_f^2} + S_{en}\left(\frac{1}{R_f^2} + \left(2\pi f C_g\right)^2\right)\right] df \qquad (272)$$

(pentru aplicarea corectă în practică a relaţiei de mai sus, trebuie să avem certitudinea că semnalul studiat respectă condiţia de 'valoare medie nulă' – vezi discuţia prezentată în legătură cu formula 254).

Prin efectuarea integralei de mai sus, deducem pentru valoarea deviaţiei standard a acestor fluctuaţii de curent electric ('*root mean square*' – r.m.s.):

$$\sigma_I^{in} = \sqrt{S_{in} B + \frac{S_{ef}}{R_f^2} B + S_{en} \frac{B}{R_f^2} + \frac{4}{3}\pi^2 C_g^2 B^3} \qquad (273)$$

În continuare, vom face o analiză numerică a acestui rezultat: astfel, pentru un rezistor de feed-back de 50 GΩ, densitatea de putere spectrală a fluctuaţiilor de curent induse de prezenţa lui este de 3.2×10^{-31} (A^2/Hz). Dacă banda de trecere a sistemului analizat este de 10 kHz, valoarea r.m.s a acestor fluctuaţii termale este de 0.057 pA. Pentru aceeaşi bandă de trecere, valoarea r.m.s. a zgomotului termal cauzat de prezenţa sursei i_n este de 0.025 pA. De asemenea, pentru un amplificator operaţional tipic, valoarea S_{en} este cuprinsă între 4 – 9 nV^2/Hz; ştiind că valoarea lui C_g este de ~ 15 – 20 pF, valoarea r.m.s pentru ultimul termen din expresia de mai sus este de ~ 0.15 pA. Astfel, valoarea totală a cantităţii r.m.s. (pA) a fluctuaţiilor de curent electric de la intrarea convertorului analizat este dată de expresia:

$$r.m.s.(total) = \sqrt{0.057^2 + 0.025^2 + 0.15^2} = 0.16 pA \qquad (274)$$

Semnificaţia acestui rezultat este următoarea: în contextul fizic exprimat de relaţiile 269-274, peste orice semnal de curent electric (util) aplicat la intrarea unui convertor curent-tensiune rezistiv modelat ca în Fig. 104, este suprapus un curent electric fluctuant, termal, ce are valoarea r.m.s. de 0.16 pA; astfel, dacă amplitudinea semnalului electric util este suficient de mare în raport cu 0.16 pA, el va fi uşor discernabil de componenta zgomotului termal dat de elementele reale de circuit din componenţa circuitului operaţional utilizat. Din nefericire, pe lângă această sursă de zgomot electric relativ minoră în comparaţie cu amplitudinea curenţilor electrici mediaţi de cele mai multe canale ionice în condiţii fiziologice, există şi alte componente 'parazite' de fluctuaţii de curent electric asociate cu un instrument de măsură '*patch-clamp*' ce pot afecta detrimental procesul de măsură şi a căror descriere va fi dată în cele ce urmează.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

10.4 Zgomotul electric indus de elementele de circuit externe convertorului curent-tensiune

Una din cele mai importante contribuții de zgomot electric termal ce provine din exteriorul convertorului curent-tensiune este asociată cu prezența electrozilor de măsură și a membranei studiate. Astfel, primul mecanism prin care electrodul de măsură – constituit, de obicei, dintr-un microelectrod de sticlă umplut cu soluție fiziologică ce conține un fir de Ag/AgCl – contribuie la creșterea zgomotului electric termal în convertor, este de cuplare în paralel a capacității sale cu acel capacitator intrinsec amplificatorului operațional (C_g). Acest capacitor, ce provine de la reprezentarea electrică echivalentă a microelectrodului de măsură, va fi deci cuplat în serie cu sursa de fluctuații de tensiune e_n (vezi mai sus pentru definiția acestei surse), iar aceasta conduce la accentuarea fluctuațiilor de curent electric de la intrarea convertorului. Valori obișnuite de 2-10 pF pentru capacitatea electrică asociată cu electrodul de măsură pot conduce la măriri de mai mult de 50 % a zgomotului electric cauzat doar de prezența capacitorului intrinsec amplificatorului operațional (C_g).

Existența unei alte surse importante de zgomot asimilată cu electrodul de măsură, este ușor de înțeles dacă privim reprezentarea electric-echivalentă a electrodului de măsură în contact cu soluția fiziologică din mediul extern (Fig. 105).

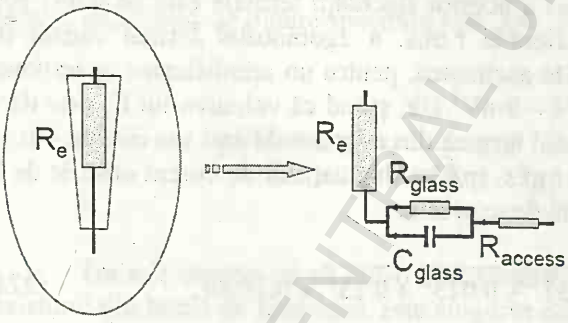


Figura 105 Reprezentarea electrică echivalentă a unui electrod de măsură în contact cu soluția fiziologică din mediul extern. R_e este o mărime asociată rezistenței electrice electrodului, R_{glass} se referă la rezistența electrică a sticlei electrodului, C_{glass} este capacitatea electrică echivalentă a sticlei electrodului, iar R_{access} este rezistența de acces a electrodului utilizat (vezi text).

Datorită fenomenelor de capilaritate, la introducerea unei micro-pipete de sticlă într-o soluție apoasă se va crea un strat subțire de soluție fiziologică pe suprafața externă a microelectrodului, a cărui rezistență electrică poate ajunge până la 100 MΩ; acest strat, împreună cu soluția fiziologică externă microelectrodului, definește rezistența electrică de acces a microelectrodului (R_{access}).

Având în vedere că orice capacitor real – și, implicit, sticla microelectrodului – este caracterizat de anumite 'pierderi dielectrice' (valoarea rezistenței sale electrice este diferită de zero, mai ales la frecvențe > 1kHz) – vom nota rezistența electrică a sticlei prin R_{glass}. Astfel, capacitatea electrică echivalentă a sticlei microelectrodului (C_{glass}) este cuplată, în paralel, cu rezistența sa electrică de pierdere.

Dacă vom considera că rezistența electrică de acces (R_{access}) este cuplată în serie cu circuitul paralel (R_{glass}, C_{glass}) și totul este cuplat în serie cu rezistența electrică

echivalentă a interiorului microelectrodului, valoarea părţii reale a impedanţei electrice a acestui circuit este dată de:

$$\mathrm{Re}(Z(\omega)) = R_{access} + R_e + \frac{R_{glass}}{1+\left(C_{glass} R_{glass} \omega\right)^2} \tag{275}$$

Astfel, în conformitate cu teoria fluctuaţiilor termice printr-o impedanţă oarecare, rezultă că densitatea de putere spectrală a fluctuaţiilor termice ale curentului electric generat de microelectrodul de măsură în contact cu soluţia fiziologică din mediul extern este dată de:

$$S_I(f) = \frac{4kT}{\mathrm{Re}(Z(\omega))} \tag{276}$$

Printre cele mai importante contribuţii la magnitudinea acestor fluctuaţii de curent electric, şi care pot fi îmbunătăţite de către experimentator, se numără R_{glass}, C_{glass} şi R_{access}. Astfel, valoarea contribuţiei dată de R_{access} poate fi redusă printr-un procedeu de aplicare a unui polimer special (Sylgard) pe suprafaţa externă a microelectrodului de sticlă şi extrem de aproape de vârful său. Caracterul puternic hidrofob al acestui polimer diminuează extrem de mult şansele ca apa să adere la suprafaţa externă a microelectrodului, mărind astfel valoarea rezistenţei de acces. Suplimentar, depunerea unui strat de polimer pe suprafaţa externă a pipetei de sticlă ce este parte componentă a microelectrodului, măreşte grosimea sa efectivă şi, deci, diminuează mărimea C_{glass}, iar, în acelaşi timp, rezistenţa electrică de pierdere a pipetei (R_{glass}) va fi mărită suplimentar.

Aşa după cum precizam la începutul acestui paragraf, o altă sursă importantă de fluctuaţii termale de curent electric o constituie combinaţia dintre reprezentarea electrică a membranei studiate şi rezistenţa electrică a microelectrodului de măsură.

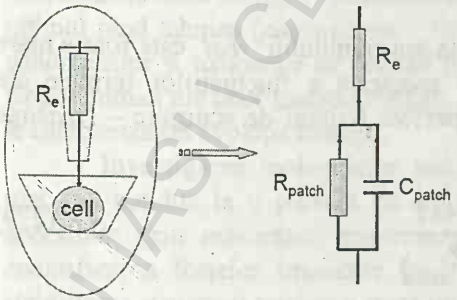


Figura 106 Reprezentarea electrică echivalentă a unui electrod de măsură, în contact cu biomembrana unei celule de interes (vezi text).

Din analiza figurii de mai sus (Fig. 106), deducem că un sistem constituit dintr-un microelectrod în contact cu biomembrana unei celule de interes poate fi reprezentat echivalent ca în panelul din dreapta, unde: R_e este valoarea rezistenţei

electrice a microelectrodului utilizat, R_{patch} şi C_{patch} reprezintă rezistenţa electrică a membranei studiate (dată, mai ales, de rezistenţa electrică a canalului ionic de interes) şi, respectiv, capacitatea echivalentă a părţii de membrană izolată de vârful microelectrodului de '*patch-clamp*'. Din considerente fizice uşor de înţeles, R_{patch} şi C_{patch} sunt dispuse în paralel şi împreună în serie cu rezistenţa electrică a microelectrodului utilizat. Din considerente perfect identice cu cele explicate anterior, valoarea părţii reale a impedanţei electrice a acestui circuit este dată de:

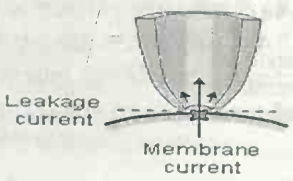
$$\mathrm{Re}(Z(\omega)) = R_e + \frac{R_{patch}}{1+\left(C_{patch}R_{patch}\omega\right)^2} \tag{277}$$

iar densitatea de putere spectrală a fluctuaţiilor termice ale curentului electric generat de microelectrodul de măsură în contact cu '*patch*'-ul de membrană ce conţine canalul ionic de interes este dată de:

$$S_I(f) = \frac{4kT}{\mathrm{Re}(Z(\omega))} \tag{278}$$

Ultima sursă majoră de fluctuaţii termale de curent electric în sistemul de măsură considerat în acest paragraf o constituie scurgerile dirijate de sarcină electrică în interspaţiul dintre vârful microelectrodului de măsură şi '*patch*'-ul de membrană izolat (Fig. 107).

Figura 107 Reprezentarea simplificată a curenţilor de scurgere ('*leakage current*') ce există între vârful microelectrodului de măsură şi '*patch*'-ul de membrană izolat, ca urmare a aplicării unei diferenţe de potenţial electric între interiorul microelectrodului şi mediul extern; '*membrane current*' este componenta de curent electric de interes, mediat de canalul ionic studiat (vezi text) (adaptat din *www*).



Altfel spus, datorită faptului că rezistenţa aşa-numitului '*seal*' este foarte mare (GΩ), dar totuşi finită, densitatea de putere spectrală a fluctuaţiilor termice ale curentului electric mediat de acest contact imperfect (curent de scurgere – '*leakage current*') este dată de formula de mai jos:

$$S_I^{seal}(f) = \frac{4kT}{R_{seal}} \tag{279}$$

Dintr-un calcul simplu, rezultă că pentru valori ale rezistenţei electrice a '*seal*'-ului de 1, 10 şi 100 GΩ şi o bandă de trecere a sistemului de conversie I-V de 10 kHz, valorile deviaţiei standard (r.m.s.) ale fluctuaţiilor de curent electric sunt de 0.4, 0.13 şi, respectiv, 0.04 pA.

BUCUREŞTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11 ANALIZA STOCHASTICĂ A PROPRIETĂŢILOR CINETICE ALE NANOPORILOR BIOLOGICI

Aşa cum anticipam în capitolele anterioare, una din întrebările fundamentale ale biofizicii moleculare se referă la conceptul de identificare cantitativă a constantelor de reacţie a tranziţiilor realizate de nanoporii biologici – canale ionice sau porine – între diferite substări moleculare. În general, proprietăţile energetice ale oricărei molecule studiate la nivel individual sunt descriptibile doar în termeni probabilistici, datorită caracterului stochastic al interacţiilor moleculare cu mediul exterior. În acelaşi context de idei, atunci când studiem proprietăţile unei singure molecule dintr-un ansamblu în care concentraţia este cunoscută, întrebarea 'care este concentraţia moleculară la momentul t' devine nejustificabilă; întrebarea corectă trebuie să se pună în termeni probabilistici, şi ar putea să sune eventual aşa: 'care este probabilitatea ca la momentul 't' molecula studiată să se afle într-o stare conformaţională dată' ? Astfel, aşa după cum subliniam şi mai sus, stăpânirea formalistică şi adoptarea unui limbaj matematic probabilistic sunt condiţii esenţiale pentru înţelegerea şi caracterizarea comportamentului unei molecule studiată individual. În funcţie de parametrul fizic măsurabil, există, în prezent, numeroase tehnici experimentale pentru investigarea proprietăţilor fizico-chimice individuale ale unor macromolecule de interes, cum ar fi: '*scanning probe microscopy*' (SPM), '*atomic force microscopy*' (AFM), '*electron tunneling*', '*near-field microscopy*', '*single molecule fluorescence microscopy*', '*fluorescence resonance energy transfer*' (FRET) şi nu în ultimul rând tehnica '*patch-clamp*'. Toate aceste tehnici, cu rezoluţii spaţiale de ordinul nanometrilor şi temporale de ordinul microsecundelor, permit cuantificarea parametrilor fizico-chimici ale unor macromolecule, precum şi identificarea unor substări energetice ce le caracterizează evoluţia cinetică.

Investigarea moleculelor individuale prin metodele fizico-chimice enunţate mai sus conduc la o pleiadă de informaţii structurale şi funcţionale, care nu ar fi accesibile prin măsurători macroscopice. Astfel, prin tehnici de AFM, s-a reuşit cuantificarea forţelor implicate în legăturile chimice necovalente ce contribuie la stabilitatea structurii terţiare a unor proteine şi a ARN-ului; tot prin această tehnică s-a reuşit măsurarea efectivă a forţelor necesare pentru ruperea unei legături chimice covalente sau a celor implicate în modificările structurale induse de foto-izomerizarea moleculei de azobenzene. Măsurători electrice realizate pe nanopori proteici funcţionalizaţi chimici au contribuit la cuantificarea, pentru prima dată, a cineticii unor

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

reacții covalente reversibile şi a permis identificarea, în timp real, a unor intermediari de reacție invizibili din măsurători macroscopice. În acest sens, au fost realizate condiții experimentale pentru observarea desfăşurării temporale a unor reacții chimice desfăşurate în apropierea porului permeant al unei molecule (nanopor proteic) de α-hemolysin. Deoarece curentul electric mediat de o singură moleculă de α-hemolysin este extrem de sensibil la mărimea moleculară, topologia şi proprietățile electrice ale reactanților ce se găsesc în regiunea sa de conducție, valoarea curentului electric mediat de nanoporul respectiv va reflecta extrem de bine desfăşurarea temporală a unor reacții chimice ce presupun modificări de tipul celor mai sus menționate.

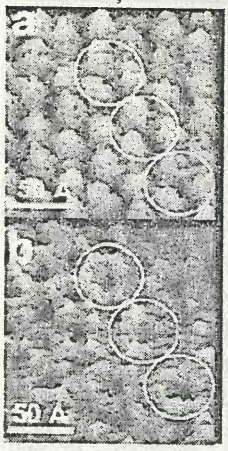


Figura 108 Vizualizarea la nivel de singură moleculă, cu ajutorul tehnicii de microscopie cu forță atomică (*'atomic force microscopy'*), a modificărilor conformaționale voltaj-dependente induse porinei OmpF. În urma modificării diferenței de potențial aplicate, dimensiunea şi forma secțiunii transversale a porinelor, aşa cum este observată din partea extracelulară, se modifică dramatic (regiunile încercuite se referă la câte o singură porină) (adaptat din *www*).

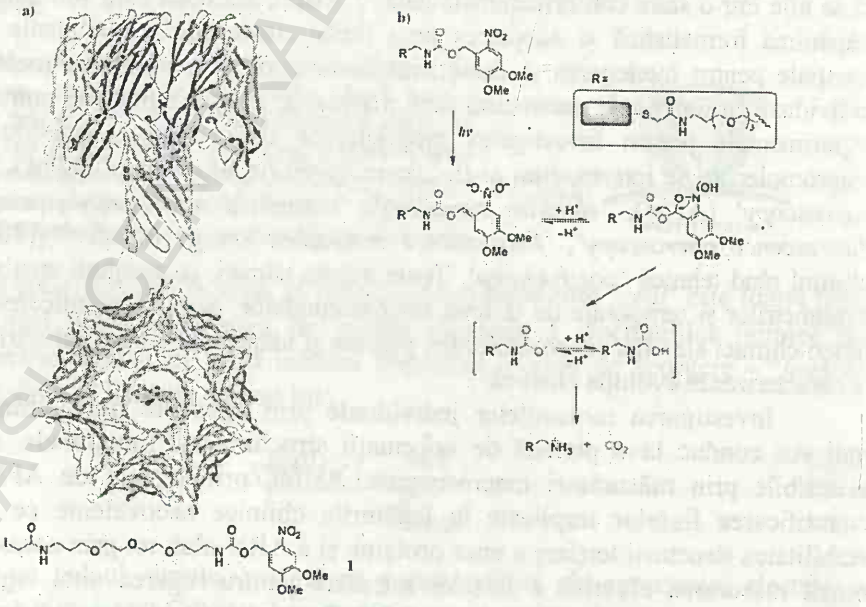


Figura 109 (a) Reprezentarea topologică a moleculei ('1'), aşa cum apare după imobilizarea sa biochimică în interiorul nanoporului α-hemolysin; în panelul (b) sunt reprezentați produşii de reacție ce apar după descompunerea fotolitică a respectivei molecule.

Pentru exemplificare, în figura de mai sus (Fig. 109) este prezentată comprehensiv metodologia de investigare la nivel de singură moleculă a produşilor de reacţie ce apar după fotoliza unui grup 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyloxycarbonyl. Molecula respectivă (marcată cu '1' în panelul a) a fost iniţial imobilizată biochimic în interiorul unui nanopor de α-hemolysin, urmând ca ulterior ea să fie iradiată cu energie din domeniul spectral UV; produşii de reacţie aşteptaţi să apară teoretic sunt cei figuraţi în panelul (b). Din cea mai simplă motivaţie, modificările structurale ale moleculei imobilizate în nanopor ce sunt asociate produşilor de reacţie enunţaţi mai sus, alterează valoarea secţiunii transversale a porului, prin aceea că mărimea intermediarilor de reacţie este diferită pentru fiecare în parte. Astfel, este de aşteptat ca valoarea curentului electric mediat de nanopor să se modifice în funcţie de natura intermediarului de reacţie 'prezent' în nanopor la un timp oarecare.

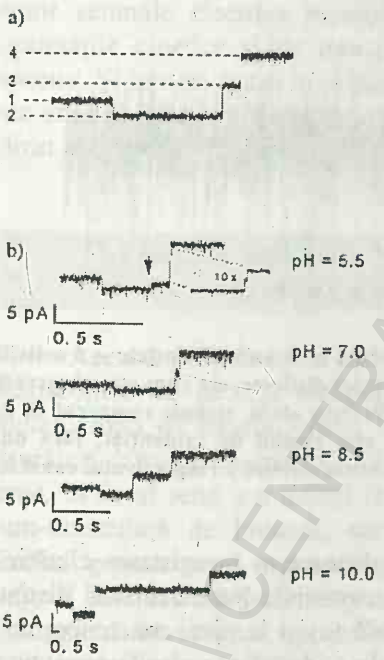


Figura 110 Vizualizarea la nivel de singură moleculă, cu ajutorul tehnicii de măsurare a curenţilor ionici mediaţi de către aceasta, a cineticii unei reacţii covalente ireversibile (vezi text). În panelul (a) sunt prezentate alterările de curent electric mediat de nanoporul α-hemolysin, atunci când molecula imobilizată în interiorul său este descompusă fotolitic. Starea conductivă '1' corespunde moleculei nefotolizate, starea '2' corespunde intermediarului nitronate ce apare imediat după absobţia unui foton de către această moleculă, starea '3' corespunde intermediarului acid carbamic, iar starea '4' corespunde ultimului produs de reacţie (grup amino protonat). Dependenţa de pH a timpului de viaţă al descompunerii acidului carbamic (panel b) confirmă identitatea acestui intermediar vizualizat prin măsurători electrice.

În figura de mai sus (Fig. 110), sunt prezentate măsurători ale modificărilor de curent electric mediat de structura proteică studiată în condiţiile în care reacţiile definite anterior se desfăşoară în interiorul nanoporului. Asociind fiecare substare conductivă observată cu persistenţă temporală limitată a intermediarilor de reacţie, s-a reuşit cuantificarea la nivel de singură moleculă a constantelor de reacţie respective.

Poate că una din cele mai importante aplicaţii ale studierii comportamentului stochastic al biomoleculelor prin metode electrice se referă la elucidarea mecanismelor de '*gating*' ale canalelor ionice. Aşa după cum precizam şi într-un capitol anterior, cele mai multe canale ionice sunt caracterizate cinetic de închiderea şi deschiderea

stochastică a porului apos. Această proprietate se numește '*gating*' și se materializează fizic prin intermediul tranzițiilor aleatoare între conformații neconductoare și conductoare pentru transportul ionic ale canalelor ionice. Proprietatea de '*gating*' este influențabilă de interacțiunea canalului ionic cu molecule extracelulare, mesageri secundari intracelulari, metaboliți, procese de fosforilare, temperatura, valoarea pH-ului, tensiuni mecanice etc. Unul dintre cei mai importanți factori fizici care afectează gating-ul canalelor ionice implicate în conducerea potențialelor de acțiune îl constituie diferența de potențial transmembranar. Evident, pentru a putea reacționa la asemenea stimuli exteriori în sensul mai sus-menționat, diferențele de energie liberă între diferitele substări moleculare trebuie să fie comparabile cu energia termică (kT); de asemenea, bariera de activare pentru tranziții moleculare asociate cu proprietatea de '*gating*' trebuie să fie relativ mică, pentru derularea eficientă în timp a respectivelor transformări moleculare.

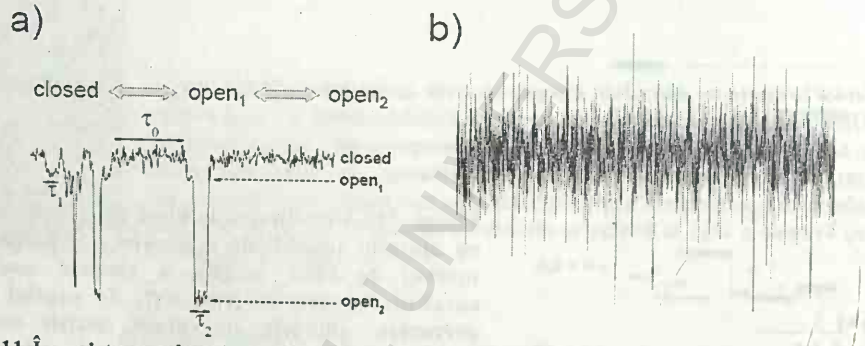


Figura 111 Înregistrare electrică – dată de evoluția temporală a curentului electric – a activității unui canal ionic ce efectuează tranziții reversibile între trei stări distincte, așa cum este observată la nivel de singură moleculă (a) și la nivel macroscopic (b). Printre altele, trebuie remarcat că doar prin înregistrări electrice la nivel de singură moleculă este posibil de evidențiat, fără dubii, prezența unor stări sub-conductive distincte ce formează schema cinetică a respectivului canal ionic ('*closed*' – '*open*$_1$' – '*open*$_2$').

În Fig. 111, este prezentată pentru exemplificare, o înregistrare electrică a activității unui canal ionic ce efectuează tranziții reversibile între trei stări distincte, așa cum este observată la nivel de singură moleculă (a) și la nivel macroscopic (b). Problema cea mai simplă ce poate fi adresată este de a identifica valorile constantelor de reacție ale tranzițiilor între substările conductive ce sunt asociate cu stări moleculare distincte ale proteinei studiate, precum și a proprietăților de transport ionic ce sunt date de conductanțele electrice ale respectivelor sub-stări. Cu asemenea informații am putea emite concluzii importante despre proprietățile cinetice și de transport ale proteinei studiate. Așa după cum este observat din analiza figurii de mai sus (Fig. 111, panel a), modificările temporale de curent electric mediat de canalul ionic studiat induc ideea unui comportament stochastic al moleculei respective, impus de tranzițiile sale aleatorii între stările conductive respective. Descrierea cinetică a canalului ionic studiat, la nivel de singură moleculă, constă în elaborarea unui formalism matematic care să facă legătura între timpii – stochastici, de altfel – cât

canalul ionic studiat se află în stările '*closed*' (τ_0), '*open*$_1$' (τ_1) şi '*open*$_2$' (τ_2), şi constantele de reacţie ce caracterizează aceste tranziţii. Această încercare este aparent şi mai complicată în cazul înregistrărilor macroscopice, în care se operează cu sisteme ce conţin mai multe asemenea proteine identice şi independente; în asemenea cazuri, modificările temporale de curent electric total lasă impresia unui semnal 'zgomotos' ('*noisy*'), iar identificarea timpilor particulari petrecuţi de canalul ionic în substările respective este imposibilă (Fig. 111, panel b). Suplimentar, în cazul înregistrărilor macroscopice, devine aparent imposibilă determinarea proprietăţilor de transport ale unui singur canal ionic, deoarece nu se pot discerne optim, ca în cazul precedent, valorile conductanţelor electrice ale substărilor moleculare de conducţie. Facem aici menţiunea importantă că din punct de vedere macroscopic, comportamentul electric 'zgomotos' al sistemului nostru este determinat, mai ales, de comportamentul stochastic al fiecăreia din moleculele constituente, ce efectuează tranziţiile aleatorii între diferitele stări conductive. Intuitiv, este deci adevărat că prin analiza inteligentă a acestor semnale electrice macroscopice am putea deduce informaţii utile despre proprietăţile cinetice şi de transport ale unei molecule individuale din ansamblul respectiv. Şi într-un caz şi în celălalt însă, datele experimentale ale activităţii canalului ionic studiat fac parte din categoria semnalelor stochastice, şi deci sunt necesare de utilizat aşa-numitele modele stochastice de analiză şi interpretare a acestor date.

11.1 Metoda '*noise analysis*' de studiere a proprietăţilor cinetice şi de transport ale canalelor ionice

Această metodă a fost elaborată pentru analiza statistică a semnalelor electrice macroscopice ce descriu comportamentul cinetic şi de conducţie ionică al unor populaţii mari de canale ionice, considerate identice şi independente. Acest tip de măsurători datează din anii 1970, iar cea mai cunoscută contribuţie ştiinţifică din acea vreme, în acest sens, s-a referit la 'zgomotul' electric indus de acetilcolină pe placa neuro-musculară de broască, care a sugerat existenţa unor receptori moleculari specifici pentru acest neurotransmiţător. Curând după aceea, metoda de '*noise analysis*' îmbunătăţită prin adoptarea tehnicii '*voltage-clamp*' a devenit un standard tehnologic de investigare a proceselor cinetice asociate cu interacţiunile moleculare de tipul 'agonist' – 'receptor'.

Pentru uşurarea înţelegerii esenţei acestei tehnici, haideţi să presupunem că măsurăm curentul electric total printr-un sistem fizic oarecare, caracterizat de conductanţa macroscopică 'G'; conform legii lui Ohm, la o diferenţă de potenţial oarecare (U), curentul electric măsurat este dat de:

$$I = GU \tag{280}$$

Dacă 'ceva' se întâmplă cu proprietăţile fizico-chimice de transport şi cinetice ale sistemului nostru, în aşa fel încât curentul electric măsurat nu este staţionar, ci devine fluctuant, mărimea şi variaţia în timp a acestor fluctuaţii este dată de expresia:

$$\delta I(t) = U(t)\delta G(t) + G(t)\delta U(t) \qquad (281)$$

Altfel spu fluctuațiile de curent electric observate prov din fluctu le de conductanță elec ă a sistemului, și din fluctuațiile de dif ă de pote al la capetele sale. În ondițiile în care menținem diferența de nțial cons ă la capetele circuitulu studiat ($\delta U(t) \equiv 0$), formula de mai sus dev

$$\delta I(t) = U\delta G(t) \qquad (282)$$

Așadar, î condiții experimentale de '*voltage-clamp* naliza fluc ții curentului electric rin sistemul nostru poate oferi informații di despre f ații de conductanță ectrică a sistemului studiat. Această te ă de st iere interpretare a fluc ațiilor de curent electric se numește '*curre se analy*' și d motivul expus m sus, implementarea ei depinde crucial d izarea te logi '*voltage-clamp*'.

În contin e, să încercăm să restrângem analiza noastr n sistem u ula cu următoarele pr ietăți ce identifică un model cinetic simplifi ig. 112):

- compus din ' canale ionice identice și independen u valoar N invariabilă î mp;
- presupunen fiecare din cele 'N' proteine realizea anzi sto ic de tip Mark între doar două stări '*open*' și '*closed*' fel, pentru ∈ (1, 2) valor probabilității de tranziție între cele dou ări în nterv de timp cuprin ntre 't' și 't + Δτ' nu depind de momen 't' ș unt de $P_{ij}(\Delta\tau) = p$ [j la $t + \Delta\tau$ | i la t] $= k_{ij}\Delta\tau$ ($\Delta\tau \to 0$ ar va rile nt invariabile imp;
- valoarea c uctanței electrice a stării '*open*' nu se odifi în t și este notată 'γ';
- valoarea po ialului nernstian pentru transportul ionic p fiec cana ic este cunoscu i este notat prin V_{Nernst}.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

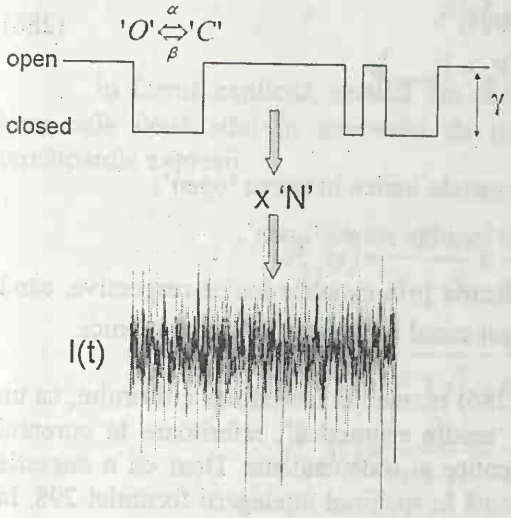


Figura 112 Fluctuaţiile curentului electric instantaneu printr-un sistem biologic compus din 'N' canale ionice distincte, identice şi independente, când fiecare din cele 'N' proteine realizează tranziţii stochastice de tip Markov între doar două stări '*open*' şi '*closed*'; conductanţa electrică a stării '*open*' este 'γ' (vezi text).

În această situaţie, valoarea curentului electric instantaneu mediat de sistemul nostru este dată de:

$$I(t) = N_O(t)(V_m - V_{Nernst})\gamma \tag{283}$$

unde $N_O(t)$ reprezintă numărul de canale ionice ce se află în conformaţia 'deschis' ('*open*') la momentul particular 't', 'γ' este conductanţa electrică a stării conductoare ('*open*') iar V_m reprezintă valoarea tensiunii electrice aplicate în sistemul nostru.

Aşadar, putem scrie:

$$\delta I(t) = \delta N_O(t)(V_m - V_{Nernst})\gamma \tag{284}$$

Relaţia de mai sus ne spune un lucru uşor de intuit: în condiţii de '*voltage-clamp*', fluctuaţiile de curent electric măsurate reflectă fluctuaţiile în numărul de canale ionice ce se află în starea '*open*' la un moment oarecare din timp. Deoarece fiecare din cele 'N' proteine este un sistem molecular cinetic, şi comportamentul cinetic, de tranziţie între cele două stări este unul stochastic, este imposibil de stabilit valoarea exactă a numărului de canale ionice aflate în starea '*open*' la un 't' dat. Aşadar:

$$N_O(t_1) \neq N_O(t_2) \neq N_O(t_3) \ldots\ldots \tag{285}$$

Eventual, pe baza unui model cinetic dat, putem aprecia care este probabilitatea de a găsi un canal ionic în starea '*open*', şi deci implicit valoarea medie a numărului de canale ionice în starea '*open*'. Se poate verifica simplu că în cazul unui sistem aşa cum a fost descris mai sus:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\overline{N_o(t)} = Np_o(t)$$
$$\overline{I(t)} = \overline{N_o(t)}(V_m - V_{Nernst})\gamma \tag{286}$$

unde:

$\overline{N_O(t)}$ este valoarea medie a numărului de canale ionice în starea '*open*';

$p_O(t)$ este probabilitatea de a găsi un canal ionic în starea '*open*';

$\overline{I(t)}$ este valoarea (medie a) curentului electric prin canalele ionice respective, când urmărim activitatea electrică nu a unui singur canal ionic, ci a 'N' canale ionice.

Argumentarea relației de mai sus (286) rămâne la latitudinea cititorului, ca un exercițiu util de înțelegere a noțiunii de 'medie aritmetică', referitoare la curentul electric măsurat prin 'N' canale ionice identice şi independente. Doar ca o sugestie utilă, cititorul poate folosi argumentația făcută în sprijinul înțelegerii formulei 298, în cazul particularizat al unui canal ionic ce realizează tranziții între doar două stări '*open*' şi '*closed*', în care valoarea curentului electric mediat de starea '*open*' este ($\gamma(V_m$-$V_{Nernst})$), iar cel mediat de starea '*closed*' este nul.

Întrebarea pe care o punem acum este următoarea: dacă, şi cum este posibil ca din analiza matematică a fluctuațiilor de curent electric prin sistemul nostru să putem deduce informații despre proprietățile cinetice şi de transport ale canalelor ionice studiate? Înainte de a răspunde analitic la această întrebare, să deducem câteva detalii cantitative interesante referitoare la evoluția temporală a sistemului nostru de canale ionice, impunând condiția arbitrară ca la momentul inițial toate canalele ionice să se afle în starea '*open*'. Pentru modelul nostru simplificat al unui singur canal ionic, cu doar două stări distincte în care starea '*open*' este notată cu '1' şi starea '*closed*' notată cu '2', ecuația Master valabilă pentru sisteme discrete descrisă anterior (95) se scrie astfel:

$$\frac{dP(t)}{dt} = P(t)\begin{bmatrix} q_{11} & q_{12} \\ q_{21} & q_{22} \end{bmatrix} \tag{287}$$

unde, ținând cont că $k_{12} = \alpha$ şi $k_{21} = \beta$:

$$Q = \begin{bmatrix} q_{11} & q_{12} \\ q_{21} & q_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\alpha & \alpha \\ \beta & -\beta \end{bmatrix} \tag{288}$$

Aşa cum am discutat anterior, soluția ecuației Master de mai sus se scrie în formă matricială astfel:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$P(t) = e^{Qt} \tag{289}$$

În formă explicită, rezultă din calcul că valorile probabilităţilor de tranziţie între cele două stări în intervalul de timp cuprins între '0' şi 't' sunt date de următoarele expresii:

$$\begin{aligned}
P_{11}(t) &= \frac{\beta}{\alpha+\beta} + \frac{\alpha}{\alpha+\beta} e^{-(\alpha+\beta)t} \\
P_{12}(t) &= \frac{\alpha}{\alpha+\beta} - \frac{\alpha}{\alpha+\beta} e^{-(\alpha+\beta)t} \\
P_{21}(t) &= \frac{\beta}{\alpha+\beta} - \frac{\beta}{\alpha+\beta} e^{-(\alpha+\beta)t} \\
P_{22}(t) &= \frac{\alpha}{\alpha+\beta} + \frac{\beta}{\alpha+\beta} e^{-(\alpha+\beta)t}
\end{aligned} \tag{290}$$

Din cele spuse în capitolul anterior cu privire la valorile probabilităţilor de tranziţie între cele două stări, se poate verifica uşor că la orice interval de timp:

$$\begin{aligned}
P_{11}(t) + P_{12}(t) &= 1 \\
P_{21}(t) + P_{22}(t) &= 1
\end{aligned} \tag{291}$$

Pentru o percepţie facilitată a acestor expresii, am reprezentat mai jos (Fig. 113) variaţia temporală a probabilităţilor de tranziţie determinate anterior, pentru un caz particular în care s-a presupus că valorile constantelor de reacţie ce definesc schema cinetică analizată sunt $\alpha = 10\ s^{-1}$ şi $\beta = 2^{s-1}$.

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

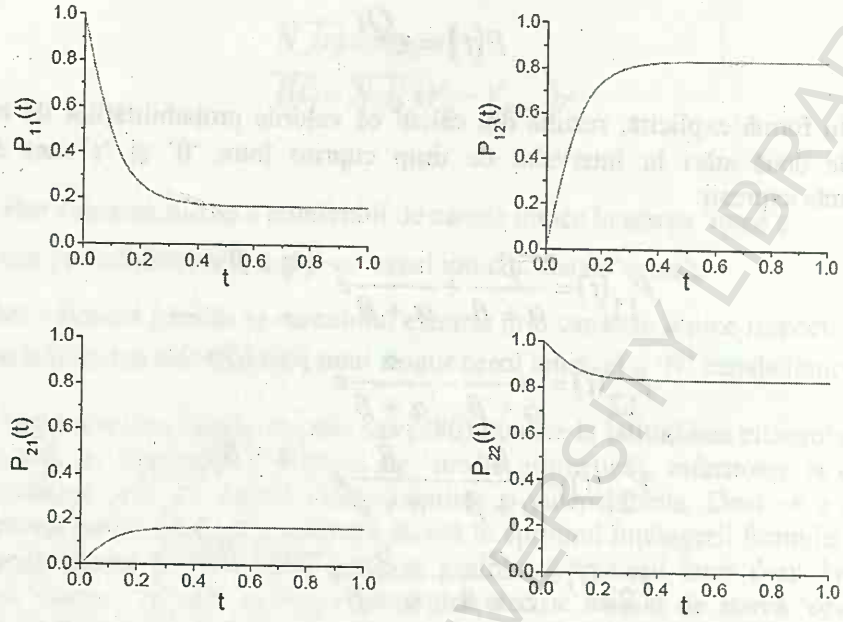


Figura 113 Reprezentarea grafică a evoluției temporale a probabilităților de tranziție între stările '1' și '2' a canalelor ionice descrise anterior (Fig. 112); în acest caz particular, s-a presupus că valorile constantelor de reacție ce definesc schema cinetică analizată sunt $\alpha = 10\ s^{-1}$ și $\beta = 2\ s^{-1}$.

După cum ne aşteptam, la momentul inițial, canalul ionic modelat nu efectuează tranziții între stările '*open*' şi '*closed*', iar probabilitatea acestui canal ionic de a nu părăsi stările '*open*' şi '*closed*' este maximă – canalul ionic este 'înghețat'. Dacă el este lăsat să evolueze de la sine, se observă că pentru un timp limitat (~ 0.4 secunde), valorile probabilităților de tranziție între cele două stări sunt vizibil dependente de timp, urmând ca după valori ale timpului ce depăşesc 0.4 secunde, aceste probabilități să devină constante. Valoarea temporală $t = \dfrac{1}{\alpha + \beta}$ se numeşte timp de relaxare, iar $(\alpha + \beta)$ se numeşte constanta de reacție de relaxare.

În conformitate cu expresia ce defineşte variația în timp a probabilității ca proteina noastră să se afle în una din cele două stări posibile :

$$p_j(t) = \sum_{i=1}^{n} p_i(0) P_{ij}(t) \qquad (292)$$

şi impunând condiția ca la momentul inițial canalul ionic se afla doar în starea '*open*' ($p_1(0) = 1, p_2(0) = 0$) putem aprecia cantitativ că:

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

$$p_1(t) = P_{11}(t) + 0P_{21}(t) = \frac{\beta}{\alpha+\beta} + \frac{\alpha}{\alpha+\beta}e^{-(\alpha+\beta)t}$$
$$p_2(t) = P_{12}(t) + 0P_{22}(t) = \frac{\alpha}{\alpha+\beta} - \frac{\alpha}{\alpha+\beta}e^{-(\alpha+\beta)t} \quad (293)$$

Reprezentarea grafică a acestor expresii este aşa cum este figurat mai jos (Fig. 114):

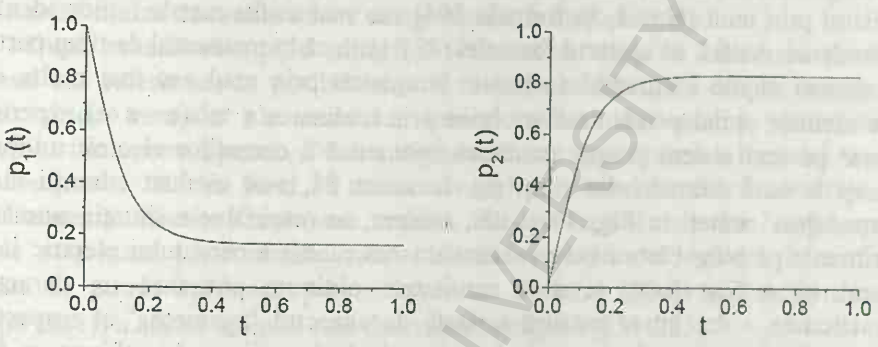


Figura 114 Reprezentare grafică a evoluţiei temporale a probabilităţii ca proteina studiată, ce este un canal ionic idealizat care realizează tranziţii stochastice de tip Markov între doar două stări '*open*' şi '*closed*', să se afle în una din cele două stări conductive distincte ; valorile constantelor de reacţie ce defineşe schema cinetică analizată sunt $\alpha = 10\ s^{-1}$ şi $\beta = 2\ s^{-1}$.

Reamintim că, iniţial, canalele ionice modelate se aflau într-o stare de echilibru, toate 'ocupând' starea '*open*'; în urma inducerii în sistemul nostru a unei perturbaţii şi lăsându-l să evolueze într-o nouă stare de echilibru, cinetica probabilităţii de ocupare a oricărei stări particulare $p_j(t)$ finale descrie o lege temporală exponenţială. Din aceleaşi argumente, un experimentator ar observa că valoarea curentului electric mediu ce provine din activitatea celor 'N' canale ionice identice şi independente ($\overline{I(t)}$), ar fi descrisă tot de o lege exponenţială dată de:

$$\overline{I(t)} = Np_O(t)(V_m - V_{Nernst})\gamma = Np_1(t)(V_m - V_{Nernst})\gamma$$
sau: (294)
$$\overline{I(t)} = N\left(\frac{\beta}{\alpha+\beta} + \frac{\alpha}{\alpha+\beta}e^{-(\alpha+\beta)t}\right)(V_m - V_{Nernst})\gamma$$

Este util de observat aici faptul că, în principiu, am demonstrat teoretic rezultatul extrem de important relevat anterior de Fig. 19 şi 88. Astfel, am arătat atunci că din punct de vedere experimental, chiar dacă la nivel de canal ionic individual ('*single channel*'), proprietăţile cinetice ale acelui canal ionic sunt caracterizabile exclusiv în termeni probabilistici, valoarea mediată a unor asemenea înregistrări de

POLITEHNICA UNIVERSITY LIBRARY

curent electric rezultate din experimente de tip '*patch-clamp*' generează un curent electric ce are, mai degrabă, o evoluție temporală deterministă. În cazul de față și prin prisma faptului că evoluția temporală a probabilității ca proteina studiată (un canal ionic idealizat, ce realizează tranziții stochastice de tip Markov între doar două stări '*open*' și '*closed*') să fie în starea '*open*' (conductivă) este o funcție exponențială, relațiile (294) demonstrează evoluția deterministă, tot exponențială, a valorii mediate a curentului electric. Din punct de vedere practic, o asemenea valoare mediată se poate obține prin utilizarea relației de definiție a valorii medii pentru o variabilă stochastică (vezi expresia 42, referitoare la '*ensemble average*') aplicată curentului electric înregistrat prin unul (N = 1, în formula 294) sau mai multe canale ionice identice și independente. Astfel, cu ajutorul formulei (42), știm că la momentul de timp particular (t), valoarea medie a curentului electric înregistrat prin unul sau mai multe canale ionice identice și independente s-ar obține prin realizarea a 'n' ($n \rightarrow \infty$) experimente distincte pe acel sistem și apoi medierea aritmetică a curenților electrici individuali măsurați la acel moment din timp (i_t). În acest fel, s-au evaluat curenții electrici 'macroscopici' arătați în Fig. 19 și 88 ; evident, în respectivele situații, numărul de experimente pe baza cărora s-a evaluat valoarea medie a curentului electric la orice moment (t) a fost finit, și deci rezultatele obținute păstrează un caracter de stochasticitate – dat într-o măsură limitată de aspectul 'zgomotos' al respectivelor valori mediate – chiar dacă trend-ul temporal rămâne, lipsit de echivoc, o funcție cvasi-deterministă. Trebuie remarcat că, pe măsură ce valoarea lui 'n' este mai mare, cu atât valoarea curentului electric mediat este descrisă cu mai mare acuratețe de expresia 294. Așadar, doar când $n \rightarrow \infty$, valoarea medie astfel evaluată devine identică cu valoarea mediei teoretice dată de expresia 294.

Ca o precizare suplimentară, trebuie menționat că în exemplul enunțat de Fig. 19, canalele ionice se aflau inițial în starea '*closed*'. Dacă presupunem că diagrama cinetică ce descrie acele canale ionice este reprezentată tot ca o serie de tranziții aleatorii între două stări ('*closed*' – conductanță nulă, '*open*' – conductanță nenulă), în conformitate cu teoria discutată mai sus, se poate verifica simplu că, în urma aplicării stimulului extern menit să inducă tranziții moleculare spre starea '*open*' – depolarizarea membranară de la –100 la +50 mV – cinetica probabilității de ocupare a stări particulare '*open*' este descrisă tot de o lege temporală exponențială. În virtutea rezultatului (294) aplicat pentru această situație, putem explica mecanicist forma exponențial-crescătoare a curentului electric mediat (Fig. 19, panelul de jos).

Identic ca pentru situația descrisă anterior, putem afirma că pentru cazul particular considerat ($\alpha = 10\ s^{-1}$ și $\beta = 2^{s-1}$), pentru intervale de timp >> 0.4 secunde canalul ionic atinge starea de staționaritate. Astfel, pentru intervale de timp >> 0.4 secunde, probabilitățile ca al nostru canal ionic să se afle în una din cele două stări devin constante. În aceste condiții, valoarea medie a fluctuațiilor de curent electric mediate de canalul ionic în discuție capătă o valoare constantă :

$$\bar{I} = Np_1(t >> 0.4)(V_m - V_{Nernst})\gamma = N\frac{\beta}{\alpha+\beta}(V_m - V_{Nernst})\gamma \qquad (295)$$

Trebuie făcută precizarea importantă că şi în aceste condiţii (t >> 0.4 secunde) vor exista fluctuaţii ale curentului electric total mediat de sistemul nostru, însă valoarea medie teoretică a acestor fluctuaţii va rămâne independentă de timpul când facem o asemenea evaluare. Pentru cei care preferă o astfel de definiţie, condiţia temporală exprimată mai sus, poate fi considerată drept un criteriu pentru timpul după care sistemul nostru de canale ionice atinge starea de staţionaritate.

După această divagaţie ştiinţifică utilă, să revenim la întrebarea punctuală pusă mai sus referitoare la posibilitatea de a deduce informaţii despre proprietăţile cinetice şi de transport ale canalelor ionice studiate din analiza matematică a fluctuaţiilor de curent electric. Pentru implementarea matematică a metodei '*current noise analysis*' – căci, în fond, la acestea se reduce fondul întrebării noastre – vom utiliza teorema Wiener-Khintchine expusă într-un capitol anterior; astfel, pentru semnale staţionare (deterministe sau stochastice) relaţia de legătură între funcţia densitate de putere spectrală '*power spectrum density*' (S(ω)) şi funcţia de auto-corelaţie (R(τ)) a acelui semnal, este descrisă de relaţiile (251-253).

Pentru sistemul nostru, semnalul de analizat este stochastic şi staţionar (considerând că facem analiza la timpi suficienţi de mari, când în sistem este indusă starea de staţionaritate – vezi mai sus), şi este tocmai curentul electric instantaneu dat de expresia:

$$I(t) = N_O(t)(V_m - V_{Nernst})\gamma$$
$$unde: \qquad (296)$$
$$\gamma(V_m - V_{Nernst}) = i(t)$$

În relaţia de mai sus, i(t) reprezintă valoarea curentului electric mediat de un singur canal ionic. După cum este uşor de înţeles, i(t) variază stochastic în timp şi 'urmăreşte', practic, tranziţiile stochastice ale unui singur canal ionic între cele două stări mai sus menţionate. Pentru raţionamentul utilizat în vederea determinării funcţiei de auto-corelaţie a curentului electric instantaneu vom utiliza un punct de plecare puţin diferit de cel exprimat de formula 296. Dacă utilizăm presupunerea că cele 'N' canale ionice sunt independente şi că fiecare din ele poate contribui la valoarea fluctuaţiilor curentului electric total, prin utilizarea unuia din rezultatele privitoare la funcţia de cros-corelaţie a 'N' semnale necorelate (267), putem scrie pentru funcţia de autocorelaţie a curentului electric total următoarea expresie:

BCU CENTRAL UNIVERSITARA LIBRARY

$$R_I(\tau) = N\langle i(t)i(t+\tau)\rangle$$
$$sau:$$
$$R_I(\tau) = N[(V_m - V_{Nernst})\gamma]^2 \Pr ob(open_{t+\tau} / open_t)\Pr ob(open_t) \quad (297)$$

Primul pas făcut pentru deducerea ecuației a 2-a din relația (297), ce explicitează expresia matematică a funcției de auto-corelație a fluctuațiilor de curent electric cauzate de 'N' canale ionice care realizează tranziții între două stări conductive, a constat în utilizarea relației de definiție pentru calcularea valorii medii a cantităților '$i(t)i(t+\tau)$', atunci când ele formează o serie discretă de valori, așa cum este sugerat de Fig. 112 (panelul superior):

$$\langle i(t)i(t+\tau)\rangle = \sum_{i,j} \Pr ob[i(t)] = a_i si \Pr ob[i(t+\tau)] = a_j \quad (298)$$

unde indicii 'i' și 'j' se referă la substările '*open*' și '*closed*' în care se poate găsi fiecare din cele 'N' canale ionice.

În sprijinul înțelegerii formulei 298, cititorul își reaminteşte probabil că într-un context general, valoarea medie a unor valori discrete x_i, ce pot apărea în cursul unor evaluări cantitative cu probabilitățile p_i, este dată de $\sum_i x_i p_i$. Particularizat pentru un canal ionic ce realizează tranziții între doar două stări '*open*' și '*closed*', în care valoarea curentului electric mediat de starea '*open*' este ($\gamma(V_m$-$V_{Nernst})$), iar cel mediat de starea '*closed*' este nul, valoarea mediată a curentului electric realizată pe ansamble sau temporal (dacă ne referim la un canal ionic aflat într-o stare staționară – vezi mai sus) prin acel canal ionic este deci dată simplu de $\langle i(t)\rangle = \overline{i(t)} = \Pr ob(open)[\gamma(V_m - V_{Nernst})]$. În acest caz – starea staționară, termenul ce cuantifică probabilitatea ca acel canal ionic să fie deschis la momentul 't' ($P(open)$) este independent de timp și deci am omis indicele 't' din exprimarea sa matematică (vezi mai sus).

Deoarece unul (oricare) din cele 'N' canale ionice realizează tranziții între doar două stări, pentru un 't' și un 'τ' fixați, suma de mai sus (298) conține doar 4 termeni: 'ii' (acel canal ionic este deschis și la momentul 't' și la momentul 't+τ'), 'ij' (acel canal ionic este deschis la momentul 't' și închis la momentul 't+τ'), 'ji' (acel canal ionic este închis la momentul 't', și deschis la momentul 't+τ') și 'jj' (acel canal ionic este închis și la momentul 't' și la momentul 't+τ'). Dacă în suma de mai sus (298) ținem seama de faptul că singurul termen ne-nul este cel în care canalul ionic este deschis și la momentul (t) și la (t+τ) (termenul 'ii'), și avem în vedere faptul că în această stare '*open*' coeficientul 'a_i' – ce definește curentul electric mediat de acel canal ionic – este finit și egal cu $\gamma(V_m$-$V_{Nernst})$, relația (298) va deveni de forma

$[(V_m - V_{Nernst})\gamma]^2 \Pr ob(open_{t+\tau}; open_t)$. Termenul probabilistic din această relaţie $\Pr ob(open_{t+\tau}; open_t)$ este deci de tip '*joint probability*' (probabilitatea ca 'ceva' să se întâmple şi la momentul 't' şi la momentul 't+τ'). Utilizând relaţia de legătură dintre '*joint probability*' şi '*conditional probability*' $\Pr ob(open_{t+\tau} / open_t)$ - expusă într-un capitol anterior, şi care se mai numeşte teorema lui Bayes), putem scrie pentru funcţia de auto-corelaţie a curentului electric mediat de un singur canal ionic următoarea relaţie:

$$\Pr ob(open_{t+\tau}; open_t) = \Pr ob(open_{t+\tau} / open_t) \Pr ob(open_t)$$
$$deci: \quad (299)$$
$$\langle i(t)i(t+\tau)\rangle = [(V_m - V_{Nernst})\gamma]^2 \Pr ob(open_{t+\tau} / open_t) \Pr ob(open_t)$$

Prin înlocuirea acestui rezultat în prima egalitate din relaţia 297, demonstrăm valabilitatea relaţiei secunde din expresia 297 (q.e.d).

Aşa cum am mai precizat anterior, în expresia (299), termenul $\Pr ob(open_{t+\tau} / open_t)$ reprezintă un termen probabilistic special ('*conditional probability*') şi se referă la probabilitatea ca unul din cele 'N' canale ionice identice şi independente să fie în starea '*open*' la momentul 't+τ' ştiind că la momentul 't' el a fost necesar în starea '*open*'. Merită menţionat că în relaţia de utilizare a funcţiei de autocorelaţie am utilizat media pe ansamble ('<>'), aşa cum este riguros pentru semnale stochastice; însă, deoarece noi implementăm această analiză pentru semnale stochastice, de tip Markov şi staţionare (vezi mai sus), facem presupunerea că semnalele sunt şi ergotice, şi deci media pe ansamble poate fi înlocuită cu media temporală dată în cazul discret de relaţia (298). Datorită aceleiaşi proprietăţi de proces Markov (şi în plus staţionar) pentru semnalul studiat, termenul $\Pr ob(open_{t+\tau} / open_t)$ se consideră a fi dependent doar de 'τ' şi independent de 't'. Pentru starea de staţionaritate în care se găsesc cele 'N' canale ionice, probabilitatea ca un canal ionic să fie deschis la momentul 't' $\Pr ob(open_t)$ este independentă de timp (aşa cum am demonstrat mai sus). În aceste condiţii, această probabilitate este dată numeric de:

$$\Pr ob(open_t) = p_1(t >>) = \frac{\beta}{\alpha + \beta} \quad (300)$$

Pe de altă parte, 'probabilitatea ca un canal ionic să fie deschis la momentul 't+τ' ştiind că el a fost deschis la momentul 't', sugerează faptul că fiind în starea '*open*' la momentul 't', acel canal ionic va fi regăsit în această stare şi după timpul

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

't+τ'; cu notațiile deja utilizate mai sus, este simplu de acceptat ca în aceste condiții, această probabilitate este tocmai $P_{11}(\tau)$ (vezi discuția referitoare la ecuația 101).

$$\Pr ob\left(open_{t+\tau} / open_{t}\right) = P_{11}(\tau) = \frac{\beta}{\alpha+\beta} + \frac{\alpha}{\alpha+\beta} e^{-(\alpha+\beta)\tau} \qquad (301)$$

Cu aceste rezultate, funcția de auto-corelație pentru curentul electric instantaneu mediat de cele 'N' canale ionice se scrie astfel:

$$R_I(\tau) = N\left[(V_m - V_{Nernst})\gamma\right]^2 \left(\frac{\beta}{\alpha+\beta}\right)\left(\frac{\beta}{\alpha+\beta} + \frac{\alpha}{\alpha+\beta} e^{-(\alpha+\beta)\tau}\right) \qquad (302)$$

Menționăm că relația de mai sus (302) se referă la descrierea procesului cinetic staționar al canalelor ionice studiate; aşadar, valoarea lui $R_I(\tau)$ nu depinde de momentul ales drept 'origine' pentru coordonata temporală. Altfel spus, $R_I(\tau) = N\langle i(t_1) i(t_1+\tau)\rangle = N\langle i(t_2) i(t_2+\tau)\rangle = ..N\left(i(t_j) i(t_j+\tau)\right)$.

Utilizând teorema Wiener-Khintchine, găsim că funcția '*power spectrum density*' pentru semnalul analizat este dată de :

$$S_I(2\pi f) = 4N\left[(V_m - V_{Nernst})\gamma\right]^2 \left(\frac{\beta}{\alpha+\beta}\right)^2 \delta(f) + 4N\left[(V_m - V_{Nernst})\gamma\right]^2 \frac{\alpha\beta}{(\alpha+\beta)^2}\left(\frac{\zeta}{1+4\pi^2\zeta^2 f^2}\right) \qquad (303)$$

cu:

$$\zeta = \frac{1}{\alpha+\beta}$$

Astfel, cu excepția cazului pentru care $\delta(f) \neq 0$ – ce se referă la partea exclusiv ne-fluctuantă, continuă, a semnalului de curent electric analizat – forma analitică a funcției '*power spectrum density*' are expresia unei dependențe de tip Lorentz, iar reprezentarea spectrală respectivă se numeşte spectru lorentzian. Pentru o exprimare matematică simplificată, vom face uz de câteva expresii statistice aplicabile sistemului nostru; fără a include aici o abordare mai extinsă, afirmăm că pentru sistemul nostru aflat în starea staționară, probabilitatea $P(N_O)$ de a găsi exact 'N_O' canale ionice în starea 'open' din cele 'N' existente, ascultă de o lege de distribuție binomială:

$$P(N_O) = \frac{N!}{N_O!(N-N_O)!}\left(\frac{\beta}{\alpha+\beta}\right)^{N_O}\left(\frac{\alpha}{\alpha+\beta}\right)^{N-N_O} \qquad (304)$$

Varianța acestei distribuții este dată de:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\sigma_{N_O}^2 = N\left(\frac{\beta}{\alpha+\beta}\right)\left(\frac{\alpha}{\alpha+\beta}\right) \tag{305}$$

Astfel, expresia varianţei fluctuaţiilor de curent electric – care sunt dictate de fluctuaţiile în numărul de canale ionice aflate în starea 'open' (N_O) – devine:

$$\sigma_I^2 = \sigma_{N_O}^2\left[\gamma\left(V_m - V_{Nernst}\right)\right]^2 = \left[\gamma\left(V_m - V_{Nernst}\right)\right]^2 N\left(\frac{\beta}{\alpha+\beta}\right)\left(\frac{\alpha}{\alpha+\beta}\right) \tag{306}$$

Cu aceste rezultate şi prin utilizarea relaţiei 303, forma analitică a funcţiei '*power spectrum density*' aplicabilă pentru domeniul de frecvenţe diferit de zero (adică ne referim la componenta exclusiv fluctuantă a semnalului de curent electric analizat, pentru care putem scrie $4N\left[\left(V_m - V_{Nernst}\right)\gamma\right]^2\left(\frac{\beta}{\alpha+\beta}\right)^2\delta(f) = 0$) devine:

$$S_I(2\pi f) = 4\sigma_I^2\frac{\zeta}{1+4\pi^2\zeta^2 f^2} \tag{307}$$

Dacă notăm prin f_c ('*corner frequency*') frecvenţa la care amplitudinea lui $S_I(2\pi f)$ scade la jumătate din valoarea sa maximă ($S_I(\max)$, când $f \to 0$), şi care este dată de:

$$f_c = \frac{1}{2\pi\zeta} \tag{308}$$

relaţia 307 se scrie simplificat:

$$S_I(2\pi f) = \frac{S_I(\max)}{1+\left(\frac{f}{f_c}\right)^2} \tag{309}$$

Astfel, prin evaluarea experimentală a valorii lui f_c ('*corner frequency*'), putem găsi informaţii esenţiale despre cinetica respectivelor canale ionice, prin intermediul valorii $\zeta = \frac{1}{\alpha+\beta}$.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu toate acestea, valori explicite pentru constantele de reacție 'α' și 'β' utilizate în acest formalism sunt imposibil de determinat, dacă nu mai utilizăm o ecuație care să conțină aceste necunoscute. Una din aceste ecuații ar putea fi expresia variației fluctuațiilor de curent electric, scrisă mai sus; prin măsurarea experimentală a acestei variațe și având informații despre valoarea medie a curentului electric măsurat, se pot determina valori explicite pentru constantele de reacție ce caracterizează cinetica procesului nostru. Suplimentar, expresiile de mai sus ne ajută ca în aceste condiții – când cunoaștem valori explicite pentru constantele de reacție ce caracterizează cinetica procesului nostru – să obținem și o estimare cantitativă pentru valoarea conductanței electrice a unui singur canal ionic din colecția de 'N' proteine. Această analiză se poate simplifica în cazul particular în care tranziția dintre starea '*closed*' în starea '*open*' este dependentă de concentrația unui ligand chimic ('L') – așa-numitele canale ionice ligand dependente; în acest caz particular, schema de reacție pentru un canal ionic din cele 'N' este:

$$'C' + L \underset{\alpha}{\overset{\beta}{\Leftrightarrow}} 'O' \tag{310}$$

Ținând cont că reacția chimică ce caracterizează 'deschiderea' canalului ionic devine acum de ordinul II, și dacă notăm prin [L] concentrația ligandului folosit într-un experiment oarecare, valoarea f_c ('*corner frequency*') devine:

$$f_c = \frac{1}{\alpha + \beta[L]} \tag{311}$$

Realizând condiții experimentale pentru care rata de deschidere a canalului ionic este cvasi-nulă ([L] → 0), prin aplicarea relației (311) putem determina direct valoarea constantei de reacție 'α':

$$\alpha = \lim_{[L]\to 0} \frac{1}{f_c} \tag{312}$$

În aceste condiții, pentru o valoare dată a concentrației ligandului, din măsurarea lui f_c și utilizarea constantei de reacție 'α', dedusă așa cum a fost explicat mai sus, se poate determina valoarea lui 'β'. Așadar, utilizând acest truc – aplicabil și în cazurile în care ratele de reacție pentru un canal ionic sunt modulabile de un parametru extern, accesibil experimentatorului – reușim caracterizarea completă a cineticii simple a proteinei în discuție. Suplimentar, în aceleași condiții experimentale pentru care rata de deschidere a canalului ionic este cvasi-nulă ([L] → 0), utilizând relațiile de până acum, putem stabili următoarea relație de dependență între varianța

BCU "AL. I. CUZA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fluctuaţiilor de curent electric înregistrate ($\sigma^2_{I,[L]\to 0}$), valoarea medie a curentului electric înregistrat ($\bar{I}_{[L]\to 0}$) şi valoarea conductanţei ionice individuale (γ):

$$\gamma = \frac{\sigma^2_{I,[L]\to 0}}{\bar{I}_{[L]\to 0}} \tag{313}$$

Subliniem încă o dată că estimări pentru varianţa fluctuaţiilor de curent electric, precum şi valoarea medie a curentului electric înregistrat sunt mărimi accesibile experimental. Astfel, dintr-o astfel de analiză realizată pe curenţi electrici macroscopici, putem caracteriza elegant şi procesele de transport ionic printr-un singur canal ionic.

Pentru exemplificare, în Fig. 115 sunt arătate înregistrări ale fluctuaţiilor de curent electric printr-un trimer de OmpF, în prezenţa interacţiunilor dintre monomerii acestuia şi molecule de ampicilină (AP), prezente în mediul de reacţie. Datorită caracterului electric zwiterionic, ampicilina interacţionează electrostatic cu aminoacizii bazici şi acidici din zona de constricţie a OmpF (vezi Fig. 40); astfel, gruparea carboxilat a ampicilinei interacţionează cu regiunea încărcată electric pozitiv a zonei de constricţie, iar gruparea sa amoniu interacţionează cu regiunea încărcată electric negativ a zonei de constricţie. Drept urmare a acestor interacţii, coeficientul de difuzie al unei molecule de ampicilină prin OmpF este cu mult atenuat, iar timpul petrecut de ampicilină în fiecare monomer al OmpF poate fi deci vizualizat direct din înregistrări de electrofiziologie moleculară, prin durata, atât timp cât valoarea conductanţei monomerilor respectivi rămâne alterată.

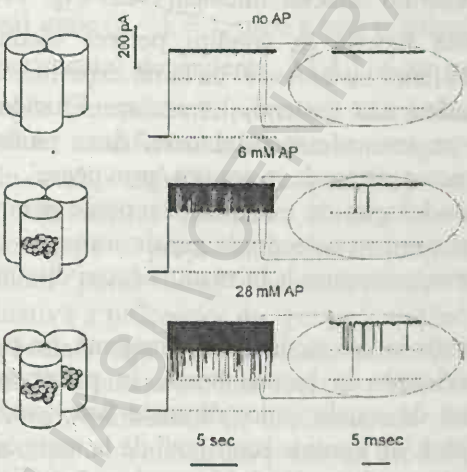


Figura 115 Înregistrări de curent electric la nivel de singură moleculă ce arată alterările de conductanţă electrică ale unui trimer de OmpF induse de către difuzia tranzientă a moleculelor de ampicilină prin acest nanopor (1 M KCl, pH 6.0, -100 mV). În absenţa moleculelor de ampicilină, curentul electric mediat de OmpF este, mai ales, constant în timp (panel superior); pe măsură ce ampicilina (AP) adăugată în mediul apos difuzează în monomerii porinului, se remarcă modificări bruşte de curent electric asociate cu obstrucţia fizică a unui monomer (mijloc) sau a doi monomeri (panel inferior) de către ampicilina ce interacţionează reversibil cu zona de constricţie a monomerilor din structura OmpF (vezi text).

Dacă modelăm aceste interacţii dintre un monomer din structura OmpF cu o moleculă de ampicilină ca fiind de tipul:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$'O'+L \underset{\alpha}{\overset{\beta}{\Leftrightarrow}} 'C' \qquad (314)$$

unde 'O' este asociată cu starea conductivă a unui monomer din structura OmpF în absența interacțiunii cu o moleculă de ampicilină (notată cu 'L'), iar 'C' este asociată cu starea parțial-conductivă a unui monomer din structura OmpF, vizibilă în prezența unei molecule de ampicilină în interiorul acestuia, prin aplicarea formalismului de mai sus se pot determina valorile constantelor de interacțiune 'α' și 'β' (Fig. 116).

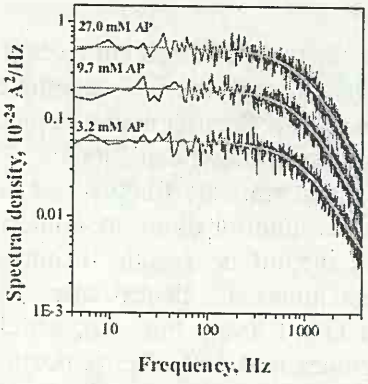


Figura 116 Reprezentări ale funcției '*power spectrum density*' a fluctuațiilor de curent arătate în Fig. 115. Fitarea bună a acestor spectre de densitate de putere spectrală, cu funcții mono-Lorentziene (curbele 'nezgomotoase', colorate în gri) confirmă mecanismul cinetic simplu ce poate descrie interacțiunea dintre monomerii din structura OmpF cu moleculele de ampicilină (AP) (expresia 307); valorile numerice ale acestor fitări dau indicații directe asupra constantelor de interacțiune 'α' și 'β'. Pentru aceste analize, se consideră că interacțiunile dintre cei 3 monomeri din structura OmpF și ampicilină sunt identice și independente. Astfel, valoarea lui 'N' din formula 306 aplicabilă acestui fenomen este '3'.

Un cititor atent ar putea ridica aici un foarte important semn de întrebare: dacă expresiile 307 și 309 indică, fără nici un dubiu, valori deterministe, fixate, ale cantității '*power spectrum density*' $S_I(2\pi f)$ în funcție de frecvența la care această cantitate este evaluată, cum se face că, experimental, dependența experimentală a funcției $S_I(2\pi f)$ de frecvență indică un relativ puternic caracter fluctuant (vezi Fig. 116)? Cu alte cuvinte, dacă s-ar evalua această funcție în condiții perfect identice, reprezentarea sa grafică ar prezenta o variabilitate 'instantanee' de la un experiment la un altul, păstrându-se neafectat doar trend-ul său general, lorentzian. Elucidarea răspunsului la această 'dilemă' o lăsăm pe seama cititorului care, doar pe baza informațiilor cuprinse în această lucrare, ar putea răspunde la această 'provocare'.

Există însă limitări serioase ale metodologiei de mai sus, dezvoltate pentru a caracteriza cinetica și procesele de transport printr-o colecție de canale ionice și care apar tocmai din generalizarea condițiilor restrictive impuse la începutul acestei discuții:

a. Am considerat că populația de canale ionice studiată este omogenă din punct de vedere al speciilor de canale ionice existente în biomembrană. În membranele celulelor biologice însă, există densități mari de canale ionice distincte funcțional. În acest caz, fluctuațile de curent electric analizate vor conține contribuții de la toate canalele ionice diferite funcțional, existente în porțiunea ('*patch*') de biomembrană studiată.

b. Am presupus că aceste canale ionice studiate sunt independente, adică proprietățile cinetice, de '*gating*', ale oricărui canal individual sunt independente de proprietățile canalelor ionice din imediata sa vecinătate. Există însă multe situații experimentale în care s-a demonstrat prezența interacțiunilor între canale ionice

distincte, în sensul că afirmaţia de mai sus devine falsă. Prezenţa acestor interacţiuni şi efectele induse în comportamentul cinetic molecular al canalelor ionice sunt denumite procese de cooperativitate. Într-o asemenea situaţie, funcţia de autocorelaţie a unei populaţii de canale ionice nu se va mai calcula aşa cum a fost arătat mai sus.

c. În exemplele abordate mai sus, s-a presupus că, din punct de vedere molecular, canalul ionic poate face tranziţii între doar două conformaţii distincte din punct de vedere al măsurătorilor electrice (i.e., conductanţa nulă – '*closed*' şi finită – '*open*'). În natură însă, lucrurile nu stau astfel; majoritatea covârşitoare a canalelor ionice au schema cinetică mult mai complicată, existând mai multe stări moleculare 'închis' şi 'deschis' ce formează '*gating*'-ul lor. Dacă toate stările tip 'deschis' au aceeaşi conductanţă, ipoteză care nu poate fi verificată pentru o specie particulară de canal ionic, decât prin analize de tip 'patch-clamp', spectrul de puteri al fluctuaţiilor de curent macroscopic ale unei populaţii de 'N' canale ionice ce realizează tranziţii între k stări moleculare distincte (în cazul de mai sus, k = 2) va fi dat de formula generală:

$$S(f) = const. \sum_{i=1}^{k-1} a_i \frac{\theta_i}{1 + 4\pi^2 f^2 \theta_i^2} \qquad (315)$$

În formula de mai sus (315), termenii *const.* şi a_i sunt constante pentru populaţia de proteine studiate, iar spre deosebire de situaţia simplificată de mai sus, θ_i sunt combinaţii liniare ale tuturor ratelor de tranziţie din schema cinetică a canalului ionic. De aceea, în situaţiile descrise mai sus, nu mai este posibilă evaluarea precisă a constantelor de reacţie, aşa cum am făcut în cazul schemei simplificate de mai sus. Pentru cazul real considerat, informaţiile extrase în urma unei astfel de analize se referă la numărul total (n) de stări ('închis' şi 'deschis') ce constituie 'gating'-ul unui canal ionic (n = k + 1, unde k este numărul de funcţii tip Lorenz, necesare pentru a fita experimental dependenţa $S(f)$ şi se poate aprecia global dacă un anumit factor exogen (temperatură, potenţial, interacţiunea dintre canale ionice şi liganzi specifici) produce modificări ale proceselor de '*gating*' (evaluat prin modificări ale parametrilor θ_i în condiţii experimentale specifice). Cu toate aceste 'neajunsuri', tehnica de analiză a proprietăţilor canalelor ionice '*current-noise*' a fost singura posibilitate de investigaţie a proprietăţilor microscopice ale canalelor ionice, până la inventarea tehnicii '*patch-clamp*'. Această tehnică a jucat un rol foarte important în analiza calitativă a proceselor de '*gating*', ajutând astfel la înţelegerea mai bună a proceselor moleculare care fundamentează existenţa departe de echilibru a celulelor vii şi deci a vieţii. Nu putem încheia acest capitol, fără a mai face câteva menţiuni cu privire la aspecte suplimentare de implementare practică a tehnicii de '*current noise analysis*'. Aşa după cum anticipam şi într-un capitol precedent, caracterul de 'zgomot electric' al sistemului de canale ionice de studiat este întotdeauna afectat de proprietăţile de zgomot electric termal al conductorilor electrici din componenţa unui sistem de tip '*patch-clamp*'. Într-o exprimare comprehensivă, am arătat anterior că fluctuaţiile termale de curent electric al unui sistem electric pasiv şi care pot interfera dramatic cu

fluctuațiile de curent electric cauzate de cinetica canalelor ionice studiate de interes sunt date de:

$$S_I^{thermal}(f) = \frac{4kT}{\mathrm{Re}(Z(f))} \tag{316}$$

unde (Z) este valoarea impedanței electrice echivalente a sistemului respectiv.

În cazul ipotezei simplificatoare care presupune necorelarea acestor surse de zgomot electric termal cu fluctuațiile de curent electric ce sunt cauzate de cinetica acelor canale ionice studiate, utilizând teorema Wiener-Khintchine se poate demonstra ușor că:

$$S_I^{total}(f) = S_I^{thermal}(f) + S_I^{channels} \tag{317}$$

unde:

- $S_I^{total}(f)$ este spectrul de densitate de putere spectrală totală a fluctuațiilor de curent electric măsurate în sistem;
- $S_I^{thermal}(f)$ este spectrul de densitate de putere spectrală termală;
- $S_I^{channels}$ este spectrul de densitate de putere spectrală asociat fluctuațiilor de curent electric cauzate de cinetica acelor canale ionice studiate.

Dacă din spectrul de densitate de putere spectrală totală (semnal de interes + surse externe de zgomot electric termal) se scade spectrul de densitate de putere spectrală, măsurat în condiții de echilibru prin sistem – diferența de potențial aplicată egală cu zero – obținem o evaluare cât mai fidelă a fluctuațiilor de curent electric induse exclusiv de canalele ionice de interes (Fig. 117).

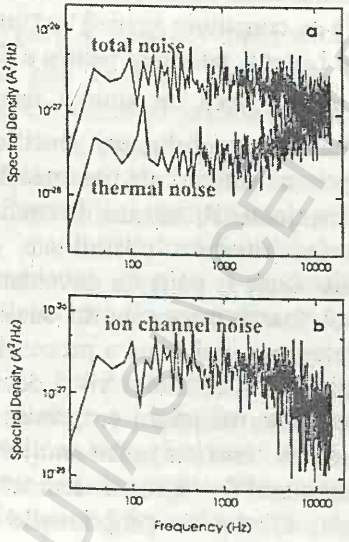


Figura 117 Reprezentări ale funcției '*power spectrum density*' pentru fluctuațiile de curent totale ('*total noise*') printr-o membrană lipidică artificială ce conține canale ionice, a căror cinetică trebuie elucidată. Dacă din acest semnal este scăzută algebric contribuția funcției '*power spectrum density*' dată de zgomotul electric termal ('*thermal noise*') – panelul 'a', se obține reprezentarea funcției '*power spectrum density*' pentru fluctuațiile de curent induse exclusiv de procesele mediate de canalele ionice studiate ('*ion channel noise*') – panelul 'b'.

Pe lângă aceste surse exogene de fluctuații de curent electric ce interferează cu procesul studiat, există și alte surse de zgomot electric ce țin de arhitectura și

proprietăţile biochimice şi biofizice ale canalelor ionice şi a biomembranelor în care ele sunt funcţionale.

Tabel 9 Descrierea comprehensivă a surselor de fluctuaţii suplimentare de curent electric ce se suprapun peste semnalul de interes, în cazul utilizării tehnicii de '*current noise analysis*' pentru caracterizarea proprietăţilor cinetice ale canalelor ionice.

Sursa de fluctuaţii	Tip spectral	Domeniul de amplitudine (A^2/Hz)
Modificări de conformaţie proteică	Lorentzian, 1/f	$10^{-21} - 10^{-29}$
Ionizarea aminoacizilor din structura proteinelor transportoare	Lorentzian	$10^{-23} - 10^{-29}$
Transportul moleculelor neutre electric	Difuzional, Lorentzian	$10^{-24} - 10^{-29}$
Ionizarea lipidelor membranare	Difuzional, Lorentzian	$10^{-29} - 10^{-30}$
'Shot noise'	Alb ('*white noise*')	$10^{-29} - 10^{-30}$
'Johnson noise'	Alb ('*white noise*')	$10^{-29} - 10^{-30}$

În tabelul următor (Tabel 9), prezentăm succint aceste surse de fluctuaţii suplimentare de curent electric ce se suprapun peste semnalul de interes.

Cu toate dificultăţile experimentale ce pot îngreuna crearea acelor condiţii care să facă aplicabilitatea cât mai eficientă a tehnicii '*current noise analysis*' pentru deducerea de informaţii relevante despre proprietăţile cinetice şi de transport ale unor canale ionice de interes, trebuie subliniat că această metodă este capabilă să furnizeze informaţii invaluabile despre structura şi funcţiile canalelor ionice; astfel, implementarea acestei tehnici a condus la o înţelegere superioară a mecanismelor moleculare ce stau la baza unor manifestări patologice în organismele vii, precum şi la dezvoltarea de noi medicamente pentru tratarea unor boli cronice.

11.2 Analiza globală a proprietăţilor canalelor ionice din înregistrări experimentale de tip '*patch-clamp*'

În capitolul anterior, am subliniat faptul că unele din întrebările fundamentale legate de structura şi funcţiile canalelor ionice se referă la estimarea numărului exact de stări moleculare (de tip 'închis' şi 'deschis') pe care le poate asuma un canal ionic, la determinarea ratelor de tranziţie între aceste stări, precum şi la analiza proceselor de transport ionic mediate de acele canale ionice. Aşa cum este uşor de înţeles acum, abordarea analitică a acestor problematici pornind de la baza ştiinţifică dată de înregistrări experimentale de curent electric mediate de canalele ionice investigate, depinde esenţial de schema de reacţii moleculare ale unei specii particulare de canale ionice. De asemenea, pentru analiza corectă a acestor date experimentale ce pot proveni de la înregistrări macroscopice (vezi mai sus) trebuie să existe certitudinea că acele

canale ionice se constituie într-o populație omogenă, în care toate proteinele respective provin din aceeași sub-clasă de canale ionice. În aceste condiții, deducerile științifice consolidate de implementarea tehnicii '*current noise analysis*' sunt aplicabile pentru fiecare canal ionic în parte, asigurând astfel caracterizarea biofizică a respectivei proteine. Pentru aceasta, înregistrările de tip '*patch-clamp*' sunt esențial de realizat experimental, deoarece aceasta este cea mai fezabilă tehnică ce permite vizualizarea directă a tranzițiilor moleculare realizate de un singur canal ionic, precum și studierea fenomenelor de transport ionic prin fiecare substare conductivă a unui canal ionic. Pentru a întări afirmația de mai sus, să privim înregistrările experimentale de mai jos:

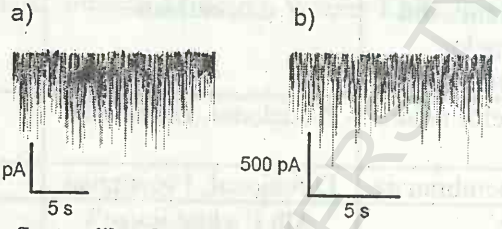


Figura 118 Reprezentări ale fluctuațiilor de curent electric macroscopic mediate de canale ionice de potasiu de tip '*inward-rectifier*' (a) și de alameticină (b).

Fără a intra în detalii experimentale, spunem doar că înregistrarea de curent electric prezentată în panelul (a) provine de la canale ionice de potasiu de tip '*inward-rectifier*', iar cea din panelul (b) provine de la alameticină. Provocarea pentru cititorul interesat este următoarea: uitându-vă la figura de mai sus, puteți deduce cu certitudine care este numărul minim de substări conductive pentru cele două tipuri de canale ionice? Cu alte cuvinte, puteți stabili o schemă de reacție tentativă pentru cinetica celor două tipuri de canale ionice?

Să privim însă acum înregistrările făcute pe aceleași canale ionice, dar implementând tehnica '*patch-clamp*' și izolând, pentru analizat, doar un singur canal ionic, din fiecare populație descrisă anterior.

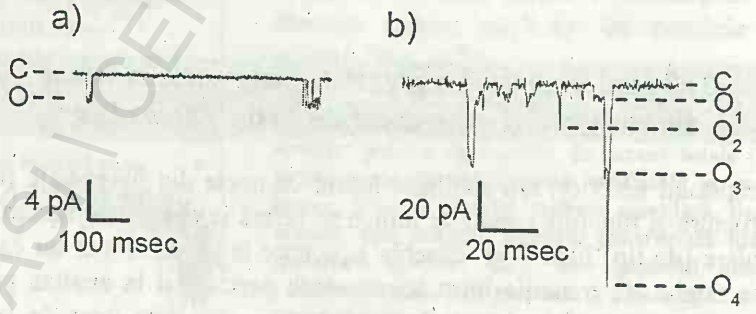


Figura 119 Reprezentări ale fluctuațiilor de curent electric microsopic, mediate de un singur canal ionic de potasiu de tip '*inward-rectifier*' (a) și de alameticină (b) (vezi text).

După cum este foarte ușor de remarcat (Fig. 119), canalul ionic de potasiu – panel (a) este caracterizat de cel puțin două stări conductive notate prin 'C' ('*closed*') și 'O' ('*open*'), pe când cel de alameticină are cel puțin cinci asemenea stări! Astfel, elaborarea

unei posibile scheme de reacţie pentru studierea electrofiziologică a celor două tipuri de canale ionice este facilitată de cunoaşterea unui parametru extrem de important, şi anume numărul minim de stări moleculare distincte, între care proteinele studiate realizează tranziţii moleculare. Subliniem iarăşi că doar înregistrări de tip '*patch-clamp*', în care doar un singur canal ionic este investigat electrofiziologic pot oferi astfel de informaţii esenţiale pentru iniţierea caracterizării moleculare a canalelor ionice.

Pentru înţelegerea facilă a raţionamentului util în descifrarea parametrilor esenţiali ce descriu cinetica unui asemenea canal ionic, daţi de constantele de reacţie 'α' şi 'β', vom utiliza modelul cinetic cel mai simplu (Fig. 120), în care tranziţiile sale moleculare stochastice au loc doar între două stări ('*closed*' şi, respectiv, '*open*').

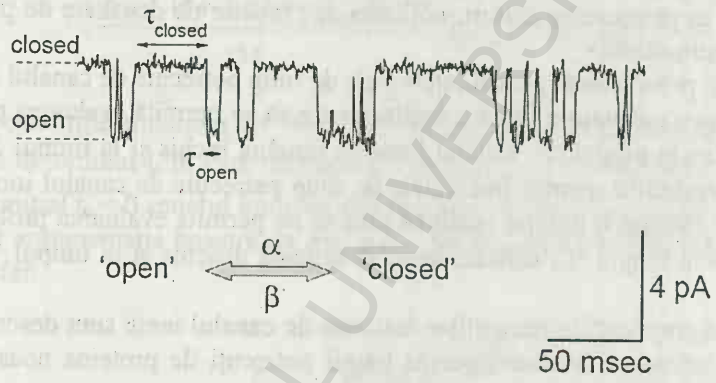


Figura 120 Reprezentări ale fluctuaţiilor de curent electric microscopic mediate de un singur canal ionic, a cărui schemă cinetică se presupune că conţine doar două stări conductive distincte: închis ('*closed*') şi deschis ('*open*').

Astfel, prima observaţie făcută cu relativă uşurinţă este ca timpii în care proteina este în una din cele două stări – 'τ_{closed}' şi 'τ_{open}' – sunt mărimi aleatorii. Este imposibil de precizat momentul în care canalul ionic realizează tranziţia moleculară într-o stare particulară, precum şi durata temporală petrecută în acea stare. Evident, este posibil ca pentru cititorul atent, aceasta să nu constituie o surpriză, date fiind informaţiile generale prezentate anterior despre comportamentul oricărei molecule – şi deci şi al unui canal ionic – observat individual.

Întrebările mari ale căror răspuns important trebuie să-l descifrăm în încercarea noastră de a caracteriza cinetica unui canal ionic, a cărui activitate este vizibilă experimental, aşa cum este prezentat mai sus, sunt următoarele:

a. se poate cuantifica, din punct de vedere statistic, distribuţia stochastică a numerelor reprezentate de intervalele de timp de genul 'τ_{closed}' şi 'τ_{open}' ? Sau: care este funcţia de densitate de probabilitate (pdf – '*probability density function*') pentru mărimi stochastice reprezentate de intervalele temporale 'τ_{closed}' şi 'τ_{open}' ?

b. dacă răspunsul de la întrebarea precedentă este afirmativ şi descifrabil, cum se poate utiliza funcţia de densitate de probabilitate (pdf), astfel dedusă pentru a face aprecieri cantitative asupra constantelor de reacţie 'α' şi 'β' ?

Pentru a răspunde la prima întrebare, reamintim cititorului avizat că, la fel ca pentru orice variabilă stochastică, descrierea facilă a unor astfel de varibile – intervalele de timp 'τ_{closed}' şi 'τ_{open}' – se poate face prin deducerea sau cunoaşterea apriorică a funcţiilor de densitate de probabilitate (pdf) ce caracterizează distribuţia statistică respectivă. De exemplu, cunoaşterea pdf-ului pentru distribuţia statistică a vitezelor unor molecule aflate în echilibru termic ne permite evaluarea vitezei medii, a vitezei medii pătratice, a energiei cinetice medii pentru fiecare din acele molecule (vezi capitolele anterioare). În acest caz, pdf-ul respectiv a fost dedus prin implementarea teoriei lui Langevin. Pentru cazul nostru, deducerea teoretică a funcţiei de densitate de probabilitate (pdf) pentru mărimi stochastice reprezentate de intervalele temporale 'τ_{closed}' şi 'τ_{open}' începe prin a defini punctual ce anume căutăm (este posibil ca pentru unii cititori, noţiunea de 'funcţie de densitate de probabilitate' să fie puţin intimidantă).

Într-o primă etapă, pentru intervalele de timp petrecute de canalul ionic studiat în starea '*closed*', căutăm o funcţie analitică care să ne permită evaluarea probabilităţii ca, fiind închis la timpul 't', canalul ionic să rămână închis şi la timpul 't+$\Delta\tau$' (când $\Delta\tau \rightarrow 0$); asemănător, pentru intervalele de timp petrecute de canalul ionic studiat în starea '*open*' căutăm o funcţie analitică care să ne permită evaluarea probabilităţii, ca fiind deschis la timpul 't', canalul ionic să rămână deschis şi la timpul 't+$\Delta\tau$' (când $\Delta\tau \rightarrow 0$).

Dacă proprietăţile tranziţiilor realizate de canalul ionic sunt descrise de teoria proceselor stochastice Markov, pentru timpii petrecuţi de proteina noastră în starea '*closed*', putem scrie:

$$p_{closed}(t+\Delta\tau) = p_{closed}(t)\,p_{closed}(\Delta\tau) \tag{318}$$

unde p_{closed} (t+$\Delta\tau$) este probabilitatea ca proteina studiată să fie în starea '*closed*' la timpul 't+ $\Delta\tau$', ştiind că ea a fost în acea stare la momentul 't', cu probabilitatea p_{closed} (t) şi a rămas în această stare '*closed*', după intervalul temporal '$\Delta\tau$', fapt ce se întâmplă cu probabilitatea p_{closed} ($\Delta\tau$).

Din rezultatele descrise anterior, pentru tranziţii între astfel de două stări distincte ştim că probabilitatea ca un canal ionic să efectueze o tranziţie din starea '*closed*' în starea '*open*' în intervalul de timp '$\Delta\tau$', când '$\Delta\tau$' tinde spre zero este dată de:

$$P_{closed-open} = (\beta)(\Delta\tau) \tag{319}$$

Similar, pentru tranziţiile din starea '*open*' în starea '*closed*' într-un interval de timp desemnat tot de '$\Delta\tau$', putem scrie:

$$P_{open-closed} = (\alpha)(\Delta\tau) \tag{320}$$

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Astfel, în relaţia 318, probabilitatea ca un canal ionic să rămână în starea '*closed*' în intervalul de timp '$\Delta\tau$', când '$\Delta\tau$' tinde spre zero este dată de:

$$p_{closed}(\Delta\tau) = 1 - P_{closed-open} = 1 - (\beta)(\Delta\tau) \tag{321}$$

Astfel, putem rescrie 318 după cum urmează:

$$p_{closed}(t+\Delta\tau) = p_{closed}(t)[1-(\beta)(\Delta\tau)]$$
$$\textit{sau}: \tag{322}$$
$$\frac{p_{closed}(t+\Delta\tau) - p_{closed}(t)}{\Delta\tau} = -p_{closed}(t)[(\beta)(\Delta\tau)]$$

În condiţiile amintite ('$\Delta\tau$' tinde spre zero), relaţia de mai sus devine o ecuaţie diferenţială de ordinul I, în care necunoscuta este $p_{closed}(t)$. Impunând condiţia ca la momentul iniţial $t_0 = 0$ canalul ionic se afla în starea '*closed*' ($p_{closed}(0) = 1$) – căci aşa am început argumentaţia noastră de mai sus – soluţia ecuaţiei diferenţiale de mai sus se scrie astfel:

$$p_{closed}(t) = e^{-\beta t} \tag{323}$$

Pentru a evita orice confuzie, facem precizarea că expresia de mai sus nu răspunde încă întrebării noastre puse în acest stadiu de abordare a problemei, şi anume: 'care este probabilitatea ca fiind închis la timpul 't' canalul ionic să rămână închis şi la un timp 't+$\Delta\tau$' ?'. Expresia de mai sus ne oferă doar o valoare cantitativă a probabilităţii ca la momentul particular 't' canalul ionic să fie în starea '*closed*'. La acest moment 't', când canalul ionic se afla în starea '*closed*', cu probabilitatea descrisă de relaţia de mai sus, ştiind că la $t_0 = 0$ canalul ionic se afla cu certitudine în starea '*closed*', el are două 'destine': (a) să rămână în starea '*closed*' sau (b) să realizeze o tranziţie spre starea '*open*' (Fig. 121).

BCU IAŞI / CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

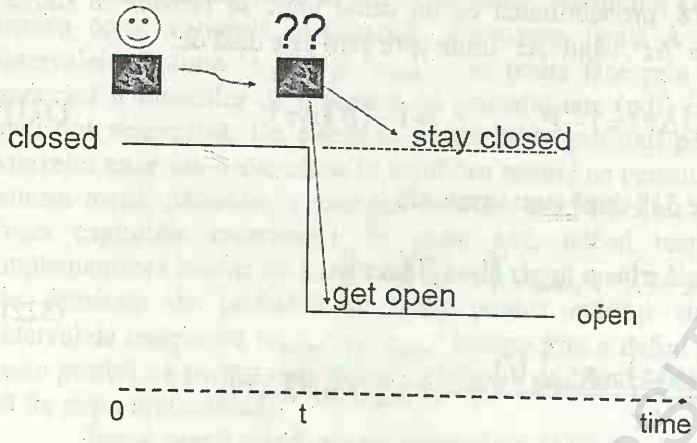


Figura 121 După timpul oarecare 't', un canal ionic aflat inițial (t = 0) în starea *'closed'* (închis), se poate afla fie în aceeași stare sau poate realiza tranziția spre o stare conductivă diferită (*'open'* – deschis).

Știind că ceva (orice !!) trebuie să se întâmple cu certitudine, probabilitatea ca el să rămână în starea *'closed'* și după timpul 't' este deci dată de:

$$R_{closed}(t) = 1 - p_{closed}(t) = 1 - e^{-\beta t} \tag{324}$$

Prin derivarea în raport cu timpul a expresiei de mai sus, obținem:

$$\lim_{\Delta\tau \to 0} \frac{R_{closed}(t+\Delta\tau) - R_{closed}(t)}{\Delta\tau} = \beta e^{-\beta t} \tag{325}$$

Prin inspecția mentală a relației de mai sus și utilizând informațiile elementare de statistică prezentate anterior în această lucrare, concluzionăm că ea oferă răspuns la întrebarea noastră inițială: 'care este funcția de densitate de probabilitate (pdf) pentru mărimile stochastice reprezentate de intervalele temporale 'τ_{closed}' ?' Astfel, utilizând relația de definiție a oricărui 'pdf', putem scrie pentru situația noastră particulară:

$$pdf_{closed} = \lim_{\Delta\tau \to 0} \frac{R_{closed}(t+\Delta\tau) - R_{closed}(t)}{\Delta\tau}$$

$$deci: \tag{326}$$

$$pdf_{closed} = \beta e^{-\beta t}$$

Urmărind un raționament perfect identic, găsim că mărimile stochastice reprezentate de intervalele temporale 'τ_{open}' sunt descrise statistic de o funcție de densitate de probabilitate dată de:

BUJIASI | CITRA UNIVERSITY LIBRARY

$$pdf_{open} = \alpha e^{-\alpha t} \tag{327}$$

În acest fel, am răspuns la prima întrebare de mai sus referitoare la posibilitatea cuantificării, din punct de vedere statistic, a distribuţiei stochastice a numerelor reprezentate de intervalele de timp de genul 'τ_{closed}' şi 'τ_{open}'. Utilizând 'pdf'-urile deduse mai sus, apreciem că intervalele de timp mai sus menţionate sunt mărimi stochastice descrise de o funcţie de distribuţie exponenţială. Întrebarea naturală ce poate fi pusă acum este: 'şi ce dacă ???' Cu ce ne ajută cunoaşterea acestor 'pdf'-uri în rezolvarea problemei noastre iniţiale, de a găsi valorile efective ale constantelor de reacţie 'α' şi 'β' ?

Făcând apel iarăşi la cunoştinţele noastre de statistică ştim că, cunoaşterea 'pdf'-ului unor variabile stochastice permite aprecierea cantitativă, teoretică, a valorii medii (de exemplu) pentru acele numere.

Astfel, pentru cazul nostru particular, putem scrie:

$$\overline{\tau_{closed}} = \int_0^\infty t\left(pdf_{closed}\right)dt = \int_0^\infty t\left(\beta e^{-\beta t}\right)dt = \frac{1}{\beta}$$

$$similar: \tag{328}$$

$$\overline{\tau_{open}} = \int_0^\infty t\left(pdf_{open}\right)dt = \int_0^\infty t\left(\alpha e^{-\alpha t}\right)dt = \frac{1}{\alpha}$$

Din punct de vedere experimental, prin realizarea de experimente de genul celor descrise mai sus, putem măsura serii de valori discrete pentru intervalele de timp cât canalul ionic este în starea '*closed*' – 'τ_{closed}' şi în starea '*open*' – 'τ_{open}'; deoarece nu putem măsura serii infinite de asemenea valori (viaţa noastră este, din fericire, finită), prin medierea aritmetică a acestor intervale de timp, putem găsi valori estimative pentru $\overline{\tau_{closed}}$ şi $\overline{\tau_{open}}$. Prin prisma rezultatului de mai sus, calculând valorile inverse ale acestor valori medii putem să găsim valori estimative pentru constantele de reacţie 'α' şi 'β'. Evident, estimările noastre vor fi cu atât mai apropiate de realitate, cu cât numărul de valori pentru intervalele de timp cât canalul ionic este în starea '*closed*' – 'τ_{closed}' şi în starea '*open*' – 'τ_{open}' utilizate pentru calcularea valorilor medii respective este mai mare. Ca o metodă de analiză alternativă, utilizând metode numerice de fitare statistică neliniară a funcţiilor pdf_{open} şi pdf_{closed} cu funcţii monoexponenţiale, se pot determina direct parametrii căutaţi iniţial, şi anume, constantele de reacţie 'α' şi 'β'.

Pentru exemplificare, în Fig. 122, este arătată o înregistrare experimentală a modificărilor temporale ale curentului electric mediat de o singură proteină α-hemolysin, induse de reacţiile reversibile dintre molecula specifică arătată în (a) şi centrul activ tiolic din structura unui monomer al proteinei α-hemolysin. Astfel, în absenţa respectivei interacţiuni (0 μM pentru concentraţia 4-sulfophenylarsane oxide),

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

curentul electric mediat de proteină este, mai ales, constant; concentrații crescătoare ale acestor molecule specifice induc stări subconductive pentru proteina α-hemolysin, datorită interacțiilor stabilite între centrul tiolic al proteinei cu moleculele respective.

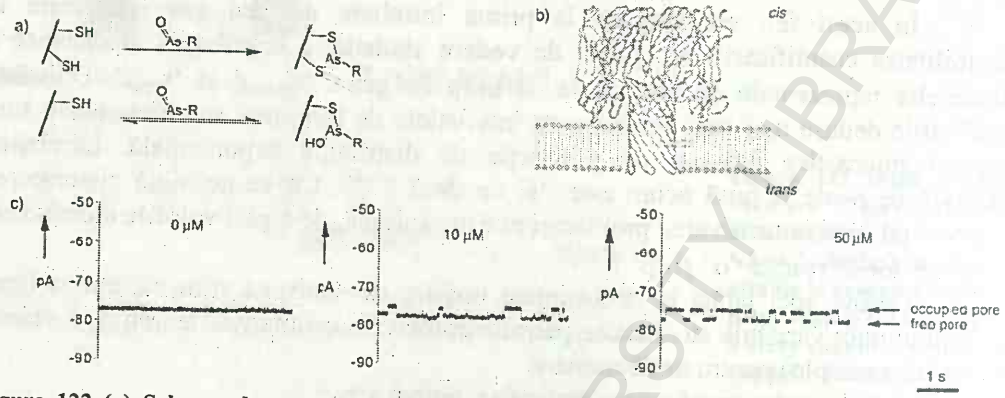


Figura 122 (a) Schema de reacție dintre o moleculă specifică (4-sulfophenylarsane oxide) și un centru activ tiolic (cisteina) din structura primară a nanoporului α-hemolysin. (b) Reprezentare dedusă din modelarea moleculară a nanoporului α-hemolysin inserat într-o membrană lipidică artificială. Colorat distinct este reprezentat unul dintre cei 7 monomeri ce constituie structura tridimensională a acestei proteine, iar punctul marcat în acest monomer este centrul activ tiolic. (c) Modificările temporale ale curentului electric mediat de o singură proteină α-hemolysin, induse de reacțiile reversibile dintre molecula specifică arătată în (a) și centrul activ tiolic din structura unui monomer al proteinei α-hemolysin.

În Fig. 122, '*free pore*' desemnează starea conductivă a proteinei α-hemolysin în absența acestor interacțiuni, iar starea '*occupied pore*' este asociată cazului în care o moleculă 4-sulfophenylarsane oxide se află temporar în interiorul porului α-hemolysin, datorită interacțiunilor covalente reversibile cu centrul tiolic activ al proteinei.

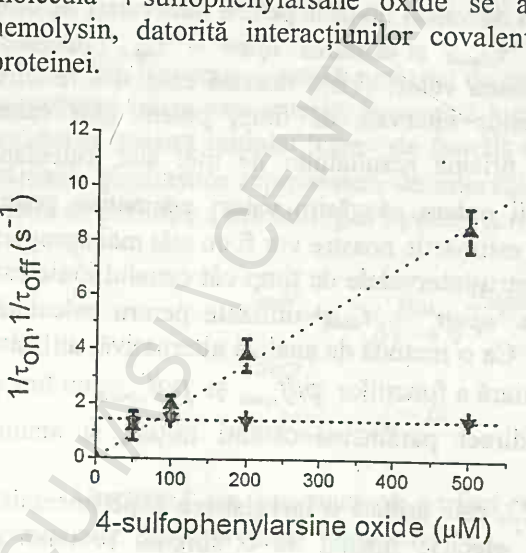


Figura 123 Dependența de concentrația moleculelor 4-sulfophenylarsane oxide a ratelor de reacție 'β' (▲; $\beta = 1/\tau_{on}$) și 'α' (▼; $\alpha = 1/\tau_{off}$) ce descriu schema de reacție dintre 4-sulfophenylarsane oxide și un centru activ tiolic (cisteina) din structura primară a nanoporului α-hemolysin (vezi text).

Cinetica interacției 'α-hemolysin' – '4-sulfophenylarsane oxide' poate fi deci caracterizată de o schemă de reacție identică cu cea discutată anterior:

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$'O'+L \underset{\alpha}{\overset{\beta}{\Leftrightarrow}} 'C' \qquad (329)$$

unde 'O' este asociată cu starea conductivă a α-hemolysin în absenţa interacţiunii cu o moleculă 4-sulfophenylarsane oxide ('*free pore*'), iar 'C', cu starea conductivă a α-hemolysin, în prezenţa unei molecule de 4-sulfophenylarsane oxide în interiorul acestuia, iar prin 'β' şi 'α' sunt desemnate ratele de reacţie ce descriu interacţiunea covalentă reversibilă descrisă mai sus.

Din analiza stochastică a timpilor cât proteina α-hemolysin este asociată cu o moleculă 4-sulfophenylarsane oxide (τ_{on} – '*occupied pore*') şi, respectiv, disociată de această moleculă (τ_{off} – '*free pore*'), aşa cum a fost descris mai sus, se pot determina direct valorile ratelor de reacţie dintre aceste structuri ilustrate de schema cinetică (329). Aşa după cum este de aşteptat, rata de reacţie de asociere este dependentă liniar de concentraţia moleculelor sulfophenylarsane oxide, pe când rata de reacţie de disociere nu depinde de concentraţia acestor molecule (Fig. 123).

Nu trebuie uitat că informaţiile derivate din formalismul prezentat mai sus sunt aplicabile doar pentru scheme cinetice simple, ce constau din doar două substări moleculare ce sunt asociate tranziţiilor moleculare efectuate de canalul ionic studiat. Pe baza raţionamentului de mai sus însă, este uşor de demonstrat că, în cazul schemelor cinetice mult mai complexe, numărul de funcţii tip exponenţial care sunt necesare pentru a fita corect histogramele timpilor '*open*' şi '*closed*' este egal cu numărul minim de stări cinetice de tip '*open*' şi '*closed*' ale canalului ionic studiat. Aşadar, este posibilă determinarea numărului minim de stări moleculare discrete din schema de reacţie a unui canal ionic, precum şi natura lor, din punct de vedere al proprietăţilor de conducţie. În ceea ce priveşte caracterizarea fenomenelor de transport prin canale ionice, aceasta devine uşor de realizat în cazul în care metoda experimentală utilizată este '*patch-clamp*'. Spre deosebire de metoda precedentă – '*current noise analysis*' – în acest caz, este posibilă vizualizarea nemijlocită a substărilor ce compun schema de reacţie a canalului ionic de studiat.

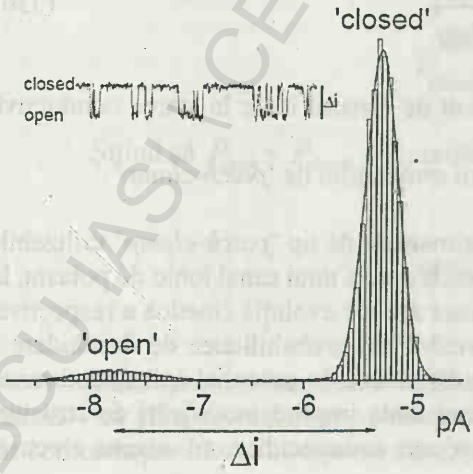


Figura 124 Reprezentarea histogramelor de amplitudini ale fluctuaţiilor curentului electric mediat de un singur canal ionic ce realizează tranziţii de tip Markov între două stări conductive ('*open*' şi '*closed*'). Chiar dacă nu este figurat explicit, pe axa 'y' (ordonată), cantităţile respective reprezintă numărul relativ de cazuri în care amplitudinea curentului electric analizat este cuprinsă în domeniul 'i(x) ÷ i(x) + δi' (δi are semnificaţie de '*bin-width*' – a se revedea definiţia noţiunii de histogramă).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După cum este prezentat şi în figura de mai sus (Fig. 124), prin construcţia aşa-numitelor histograme de amplitudini pentru fluctuaţiile curentul electric mediat de un singur canal ionic, putem determina direct valoarea curentului electric (Δi) mediat de canalul ionic în starea '*open*'. Repetarea acestor evaluări pentru curenţi electrici măsuraţi la diferite valori ale diferenţei de potenţial aplicate din exterior permite, aşadar, trasarea unei diagrame curent-tensiune ce caracterizează conducţia ionică prin canalul ionic de interes, aşa cum am prezentat anterior. O altă informaţie importantă ce poate fi dedusă din înregistrări tip '*patch-clamp*' se referă la estimarea valorii probabilităţii de deschidere ('*open probability*') a unui canal ionic, în anumite condiţii fizice. Pentru aceasta, cu ajutorul unor programe de computer special elaborate, dintr-o înregistrare '*patch-clamp*' ce arată evoluţia cinetică a unui canal ionic în timp, se estimează valoarea timpului total pe care acel canal ionic îl petrece în starea '*open*'.

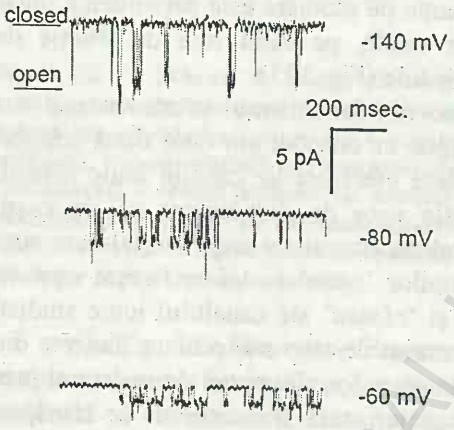


Figura 125 Reprezentarea dependenţei de diferenţă de potenţial aplicată a fluctuaţiilor curentului electric mediat de un singur canal ionic de potasiu ce realizează tranziţii de tip Markov între două stări conductive ('*open*' şi '*closed*').

Probabilitatea de deschidere (P_{open} sau '*open probability*') a canalului ionic într-o anumită stare conductivă este dată de relaţia:

$$P_{open} = \frac{t_{open}}{t_{total}} \tag{330}$$

- t_{open} reprezintă timpul total petrecut de canalul ionic în starea conductivă analizată;
- t_{total} este timpul total al înregistrării semnalului de '*patch-clamp*'.

În Fig. 125 sunt prezentate date experimentale de tip '*patch-clamp*' utilizabile pentru analiza dependenţei probabilităţii de deschidere a unui canal ionic de potasiu, în funcţie de valoarea diferenţei de potenţial la care are loc evoluţia cinetică a respectivei proteine. În acest exemplu, deoarece (este vizibil că) probabilitatea de deschidere a canalului ionic este dependentă de valoarea diferenţei de potenţial transmembranar, putem concluziona că '*gating*'-ul acestui canal ionic implică modificări de structură ale canalului ionic în care sunt implicate reziduuri aminoacidice, cu sarcina electrică

netă, diferită de zero sau caracter dipolar ce sunt localizate, cu predilecție în interiorul biomembranei.

Presupunând că acest canal ionic realizează tranziții doar într-o stare '*closed*' și una '*open*', iar aceste tranziții moleculare sunt însoțite de redistribuirea sarcinii electrice nete în interiorul biomembranei, variația de energie liberă între aceste stări ale proteinei este dată de:

$$\Delta G = G_{open} - G_{closed} = \Delta G^{o} + ze^{-}\Delta V_{closed-open} \tag{331}$$

unde:

ΔG^0 este variația de energie liberă standard a canalului ionic între stările '*closed*' și '*open*', când valoarea diferenței de potențial aplicate este nulă;

ze^- este sarcina electrică totală din structura proteinei ce este redistribuită în cursul modificărilor de conformație terțiară a canalului ionic între cele două stări '*closed*' și '*open*';

$\Delta V_{closed-open}$ este diferența de potențial electric 'simțită' de sarcina electrică (ze^-) în cursul tranziției canalului ionic între stările '*closed*' și '*open*';

$ze^-\Delta V_{closed-open} = \Delta w_{el}$. este diferența de energie electrică asociată cu deplasarea transmembranară a sarcinii electrice totale redistribuite din structura proteinei, în cursul tranziției moleculare între stările '*closed*' și '*open*'.

În acest exemplu, se neglijează contribuția sarcinilor electrice superficiale membranare la valoarea lui V (teoria Gouy-Chapman) și se consideră că potențialul electric variază liniar cu distanța prin membrană. În aceste condiții, raportul între probabilitățile ca proteina să fie în starea '*open*' (P_{open}) și '*closed*' (P_{closed}) respectă în condiții de staționaritate o lege de distribuție după energii de tip Boltzmann:

$$\frac{P_{open}}{P_{closed}} = e^{-\frac{\Delta G}{kT}} \tag{332}$$

Știind că $P_{open} + P_{closed} = 1$, relația de mai sus devine:

$$P_{open} = \frac{1}{1 + e^{\frac{\Delta G}{kT}}} \tag{333}$$

Dacă facem presupunerea suplimentară – destul de sensibilă în cele mai multe cazuri – că știm cu exactitate valoarea sarcinii electrice nete asociate cu modificările de conformație '*closed*' – '*open*', din expresia de mai sus, putem deduce un parametru

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

important care ne dă o evaluare cantitativă a distanței relative de mișcare a sarcinii electrice nete asociate cu modificările de conformație '*closed*' – '*open*', în cursul acestei tranziții.

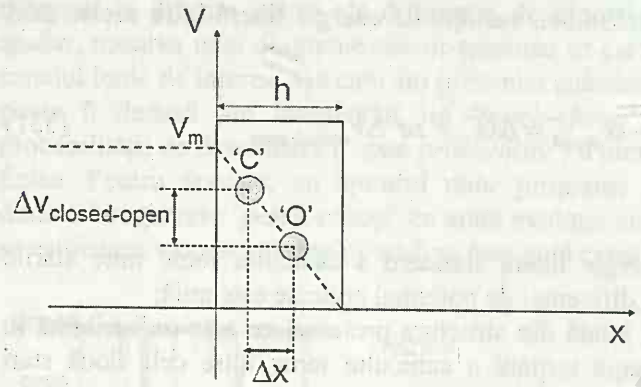


Figura 126 Modelarea simplificată a reprezentării energetice a stărilor distincte '*closed*' și '*open*' arătate în Fig. 125, așa cum ar varia în funcție de diferența de potențial transmembranar aplicată din exterior (vezi text). În acest model simplificat, biomembrana se consideră a avea grosimea 'h', iar variația cu distanța a potențialului electric prin membrană (V(x)) este liniară.

În modelul prezentat mai sus (Fig. 126), diferența de potențial transmembranar aplicată din exterior este notată prin V_m; dacă tranziția moleculară din starea '*closed*' în starea '*open*' a canalului ionic este asociată cu deplasarea unei sarcini totale ze^- pe distanța 'Δx' în interiorul membranei, variația de energie electrică asociată acestei schimbări conformaționale este dată de:

$$\Delta w_{el.} = -ze^- V_m \frac{\Delta x}{h} \tag{334}$$

Înlocuind acest rezultat în (333), putem determina o expresie cantitativă pentru dependența de diferența de potențial (V_m) a probabilității ca proteina să fie în starea '*open*' (P_{open}):

$$P_{open} = \frac{1}{1 + e^{\frac{\Delta G_o - \frac{V_m\left(\Delta x z e^-\right)}{h}}{kT}}} \tag{335}$$

Tratând factorul 'ΔG_o' ca pe un parametru constant, din fitarea neliniară cu o astfel de ecuație a curbei trasate în Fig. 127, în care s-a estimat dependența de diferența de potențial aplicată din exterior a probabilității ca proteina să fie în starea '*open*' (P_{open}), putem determina valoarea distanței relative 'Δx'. De obicei, neexistând informații certe despre valoarea termenului 'ze^-', ceea ce se determină experimental dintr-o astfel de fitare neliniară este așa-numitul 'produs sarcină-distanță', dat de '$\Delta x\ ze^-$'.

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

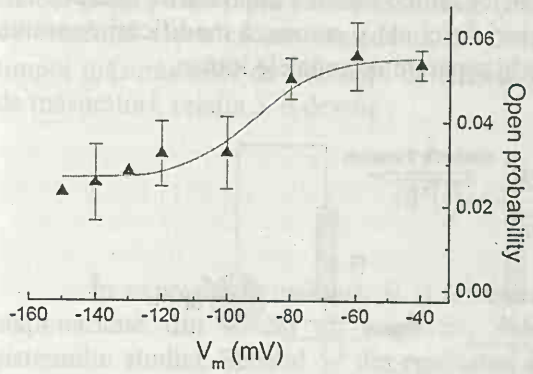


Figura 127 Dependenţa de diferenţa de potenţial aplicată din exterior (V_m) a probabilităţii ca proteina a cărei cinetică este arătată în Fig. 125 să fie în starea '*open*' (P_{open} = '*open probability*'). Valorile lui P_{open} la diferite valori ale lui V_m au fost calculate utilizând formula 330.

Concluziile unor astfel de experimente sunt esenţiale pentru înţelegerea proceselor de '*gating*' ale canalelor ionice; alterarea '*gating*'-ului unui canal ionic, fapt exprimat cel mai simplu prin modificarea probabilităţii de deschidere în diferite condiţii experimentale controlabile (e.g., diferenţa de potenţial transmembranar, interacţiunea canalului ionic cu alţi agonişti etc.), pot constitui indicii preţioase despre mecanismele fizice ce stau la baza dinamicii proteinei studiate.

11.3 Analiza spectrală generalizată a unei biomembrane excitabile

Prin intermediul acestor exemple din capitolul anterior, am ilustrat avantajele imense aduse de utilizarea tehnicii de înregistrare a activităţii electrice a canalelor ionice la nivel de 'singură moleculă' pentru descifrarea mecanismelor moleculare de permeaţie şi cinetice ale canalelor ionice. Aşa cum am spus însă la început, utilizarea acestei tehnici care să combine metoda '*voltage-clamp*' cu măsurarea activităţii canalelor ionice din diferite membrane a devenit posibilă pe scară largă abia prin anii '80. Până atunci însă, cercetătorii au dezvoltat un alt 'truc' ştiinţific care să le permită deducerea proprietăţilor cinetice şi de conducţie ale canalelor ionice membranare. Doar să reamintim cititorului: tehnica '*voltage-clamp*' este esenţială pentru implementarea metodei '*current noise analysis*'. Măsurând fluctuaţiile de curent electric în condiţii de 'voltaj nefixat', rezultatul final va conţine şi contribuţia de la fluctuaţiile de conductanţă electrică a sistemului în care suntem direcţi interesaţi, dar şi contribuţia de la fluctuaţiile de diferenţă de potenţial la capetele sale.

$$\delta I(t) = V(t)\delta G(t) + G(t)\delta V(t) \tag{336}$$

Din punct de vedere fizic, relaţia de cauzalitate între existenţa fluctuaţiilor de conductanţă electrică a unei populaţii de canale ionice şi apariţia fluctuaţiilor de diferenţă de potenţial electric în acel sistem este ilustrată în Fig. 128. Să presupunem că neglijăm într-o primă aproximaţie fluctuaţiile electrice termale din circuit; în aceste condiţii, existenţa fluctuaţiilor de rezistenţă electrică (δR) ce pot apărea datorită

proprietăților intrinseci, de '*gating*' a canalelor ionice studiate sau datorită interacțiunii lor cu mediul extern (liganzi chimici, factori fizici etc.), cauzează modificări continue ale concentrațiilor ionilor în cele două medii separate de canalele ionice.

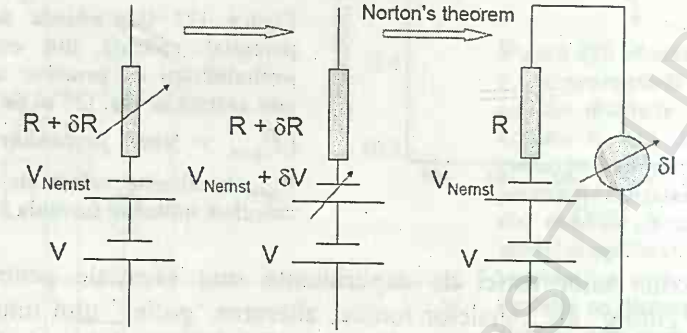


Figura 128 Relația de cauzalitate între existența fluctuațiilor de rezistență electrică a unei populații de canale ionice (δR) și apariția fluctuațiilor de diferență de potențial electric în acel sistem (δV).

Făcând apel la cunoștințele precedente (teorema lui Nernst și teorema Goldman-Hodgkin-Katz), știm că acest proces provoacă alterarea continuă a diferenței de potențial de la capetele sistemului studiat (δV); în conformitate cu legea lui Ohm, (și) aceste fluctuații de tensiune electrică produc fluctuații (suplimentare) de curent electric prin circuit. În reprezentarea echivalentă dată de teorema lui Norton (Fig. 128), putem privi sistemul nostru ca fiind cel din starea staționară, caracterizat de parametri invariabili în timp (δR=0, δV=0), cuplat cu o sursă de curent electric variabil (δI) dată de expresia scrisă mai sus. Subliniem încă o dată că dacă măsurăm aceste fluctuații de curent electric în condiții de '*voltage-clamp*' (δV=0 și V(t)=ct.=V), ele ne vor oferi informații directe despre modificările exclusive de rezistența electrică a canalelor ionice studiate, a căror cinetică dorim astfel să o investigăm:

$$\delta R(t) = \frac{1}{\delta G(t)} \tag{337}$$

Astfel, $\delta G(t)$ pot fi deduse din determinările experimentale de fluctuații de curent electric în condiții de '*voltage-clamp*' vezi relația 336) :

$$\delta I_{vclamp}(t) = V \delta G(t) \tag{338}$$

Din punct de vedere tehnic, pentru orice sistem – deci și unul biologic – putem măsura fără probleme deosebite sau restricții de formalism fizic aplicate sistemului, fluctuațiile de diferența de potențial de la capete sale; avem nevoie, în acest sens, doar de un amplificator de potențial suficient de sensibil, care să permită identificarea diferențelor mici de diferența de potențial electric (~ μV) ce apar într-un astfel de

sistem şi care sunt rapid variabile în timp (msec.). Datorită faptului că un amplificator de tensiune electrică are impedanţa de intrare foarte mare, putem considera că în timpul măsurătorilor de fluctuaţii de tensiune electrică δI = 0. Astfel, pentru acest tip de măsurători, relaţia 336 devine :

$$\delta V(t) = -\frac{V}{G}\delta G(t) \tag{339}$$

În expresia de mai sus, V şi G reprezintă valoarea diferenţei de potenţial de staţionaritate din sistem şi, respectiv, valoarea conductanţei de staţionaritate a sistemului studiat. Semnul '-' din egalitatea de mai sus nu ne deranjează, deoarece în algoritmul de transformare Fourier ce trebuie implementat pentru determinarea densităţilor de putere spectrală pentru fluctuaţiile de tensiune şi, respectiv, curent electric putem opera doar cu modulul aritmetic al acestor fluctuaţii. Din aceste ultime două relaţii (338-339), rezultă că dacă avem informaţii despre conductanţa electrică a sistemului nostru (G) şi dacă utilizăm măsurătorile de fluctuaţii de tensiune electrică, ajungem la următoarea expresie pentru acea 'parte' a fluctuaţiilor de curent electric care ne dau informaţii nemijlocite despre fluctuaţiile de conductanţă electrică a canalelor ionice studiate şi care ar fi fost accesibile doar în cazul măsurătorilor de tip '*voltage-clamp*':

$$\left|\delta I_{vclamp}(t)\right| = \left|V\frac{G\delta V(t)}{V}\right| = \left|G\delta V(t)\right| \tag{340}$$

Aşadar, în condiţiile în care avem informaţii despre valoarea conductanţei – sau într-o exprimare generală a impedanţei electrice a sistemului studiat – relaţia de mai sus (340) ne permite deducerea lui $S_I(f)$, iar cunoştinţele asimilate de la teoria '*current noise analysis*' ne pot permite, în continuare, investigarea suplimentară a proceselor cinetice şi de transport prin sistemul studiat.

$$S_I(f) = \left|G(2\pi f)\right|^2 S_V(f) \tag{341}$$

Densitatea de putere spectrală a fluctuaţiilor de tensiune ce intră în relaţia de mai sus ($S_V(f)$) se deduce uşor din algoritmul de aplicare al transformării Fourier pentru semnalul măsurat, a fluctuaţiilor de tensiune electrică $\delta V(t)$ (vezi capitolele anterioare). Astfel, în acest caz, deducem $S_I(f)$ indirect şi nu din măsurători de tip '*voltage-clamp*', aşa cum a fost prezentat anterior; odată depăşită însă această problemă, formalismul fizic de utilizat este identic cu cel descris mai sus (tehnica '*current noise analysis*').

Evident însă, semnul mare de întrebare ce rămâne pentru utilizarea practică a relaţiei (341) este: ce putem spune despre valoarea impedanţei electrice a sistemului

studiat ($G(2\pi f)$)? Pentru rezolvarea acestei probleme există două metode; cea teoretică ne permite ca, pornind de la o schemă de reacţii moleculare care descrie tentativ cinetica unor canale ionice independente şi similare, să deducem o expresie analitică pentru impedanţa electrică a unui astfel de sistem. Principial, aceasta se reduce la a determina funcţia ce descrie variaţia curentului electric printr-o populaţie de canale ionice atunci când ele sunt supuse unor variaţii ale diferenţei de potenţial transmembranar. Un exemplu elocvent în acest sens este prezentat în cele ce urmează.

Reluând o idee precedentă, valoarea curentului electric mediu printr-o membrană aflată în stare de staţionaritate, ce este supusă unei diferenţe de potenţial 'V' şi ce conţine un număr de 'N' canale ionice, dintre care doar un număr mediu de $\overline{N_o}$ canale ionice sunt deschise, este dată de următoarea expresie:

$$\bar{I} = \overline{N_o}\left(V - V_{Nernst}\right)\gamma \tag{342}$$

În cele ce urmează, facem presupunerea simplificatoare că lucrăm pe un model cinetic în care la nivel de 'singură moleculă', fiecare din cele 'N' canale ionice identice şi independente realizează tranziţii stochastice între doar două stări, caracterizate de constantele de tranziţie 'α' (tranziţia '*open to closed*') şi 'β' (tranziţia '*closed to open*').

Dacă presupunem că impunem din exterior o modificare infinitezimală a diferenţei de potenţial aplicate (δV(t)), aceasta va produce o variaţie mică a curentului electric mediu, dată de ecuaţia:

$$\delta I(t) = \gamma \overline{N_o}\delta V(t) + \gamma\left(V - V_{Nernst}\right)\delta\overline{N_o}(t) \tag{343}$$

Aşa după cum este de aşteptat, raportul $\frac{\delta I(\omega)}{\delta V(\omega)}$ este expresia mărimii de interes pentru noi, numită, în acest caz, admitanţa de semnal mic a sistemului de canale ionice. Astfel, am anticipat deja că sistemul nostru este neliniar, şi deci doar pentru variaţii mici ale diferenţei de potenţial aplicate din exterior răspunsul sistemului dat de '$\delta I(t)$' este liniar.

Evident, un cititor atent ar putea face următoarea observaţie: prin ce mecanisme o variaţie mică de diferenţă de potenţial produce variaţii pentru curentul electric mediu prin sistemul nostru de canale ionice? Există, în principiu, două asemenea mecanisme: cel descris de legea lui Ohm (o variaţie de tensiune, mică sau mare, produce o variaţie de curent electric într-un circuit rezistiv) şi un altul, mai subtil, dat de posibilitatea ca valorile constantelor de reacţie 'α' şi 'β' să depindă de valoarea diferenţei de potenţial aplicate (α = α(V) şi β = β(V)). Acest ultim mecanism induce o stare de nestaţionaritate în sistemul nostru prin alterarea numărului mediu de canale ionice ce vor exista în starea conductivă cu un termen dat de '$\delta\overline{N_o}(t)$' (acesta

este cazul canalelor ionice voltaj-dependente). Matematic, relaţiile cauzale, fizice între procesele ce au loc în sistemul nostru se pot exprima astfel:

$$\begin{array}{c} V \rightarrow V + \delta V \\ \downarrow \\ \alpha \rightarrow \alpha + \delta\alpha \\ \beta \rightarrow \beta + \delta\beta \\ \downarrow \\ \overline{N_o} \rightarrow \overline{N_o} + \delta\overline{N_o} \\ \downarrow \\ I \rightarrow \bar{I} + \delta I \end{array} \qquad (344)$$

Aşa cum am arătat mai sus, din punct de vedere cinetic, starea de nestaţionaritate pentru un astfel de sistem este caracterizată de variaţia continuă a numărului mediu de canale ionice aflate în starea '*open*' conductivă la un timp oarecare 't' şi ce este dat de soluţia ecuaţiei diferenţiale:

$$\frac{d\left[\overline{N_o} + \delta\overline{N_o}(t)\right]}{dt} = (\beta + \delta\beta)\left(N - \overline{N_o} - \delta\overline{N_o}(t)\right) - (\alpha + \delta\alpha)\left[\overline{N_o} + \delta\overline{N_o}(t)\right] \qquad (345)$$

Efectuând calculele de mai sus şi neglijând produsele între cantităţi infinitezimale, variaţia temporală a termenului $\delta\overline{N_o}(t)$ este dată de următoarea ecuaţie diferenţială:

$$\frac{d\left[\delta\overline{N_o}(t)\right]}{dt} = \left[N - \overline{N_o}\right]\delta\beta - \beta\delta\overline{N_o}(t) - \alpha\delta\overline{N_o}(t) - \overline{N_o}\delta\alpha \qquad (346)$$

După un timp oarecare de la înlăturarea perturbaţiei δV(t), ce este determinat de valoarea constantelor de reacţie 'α' şi 'β', sistemul va atinge o nouă stare de staţionaritate în care, evident, $\delta\overline{N_o}(t)$ tinde spre zero. De obicei, pentru astfel de canale ionice, forma de variaţie cu diferenţă de potenţial a constantelor de reacţie 'α' şi 'β' nu este liniară; presupunând însă că variaţia de diferenţa de potenţial δV(t) indusă din exterior este suficient de mică încât variaţia constantelor de reacţie 'α' şi 'β' să fie liniară cu diferenţa de potenţial aplicată, putem scrie :

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\alpha = \alpha(V); \beta = \beta(V)$$

deci:

$$\delta\alpha_V = \frac{d\alpha}{dV}_V \delta V \qquad (347)$$

$$\delta\beta_V = \frac{d\beta}{dV}_V \delta V$$

unde '$\delta\alpha$' şi '$\delta\beta$' semnifică variaţia constantelor de reacţie 'α' şi 'β' când diferenţa de potenţial aplicată din exterior se modifică de la 'V' la 'V + δV' iar $\frac{d\alpha}{dV}_V$ şi $\frac{d\beta}{dV}_V$ reprezintă pantele dependenţelor constantelor de reacţie 'α' şi 'β' de diferenţa de potenţial aplicată, măsurate în punctul 'V'.

Pentru cei ce preferă o exprimare mai concisă a ceea ce am făcut mai sus, putem spune că am liniarizat răspunsul sistemului nostru de canale ionice voltaj-dependente, în raport cu diferenţa de potenţial aplicată din exterior. Cu aceste notaţii, ecuaţia noastră ce descrie variaţia temporală a termenului $\delta\overline{N_o}(t)$ devine:

$$\frac{d\left[\delta\overline{N_o}(t)\right]}{dt} = \left\{\left[N - \overline{N_o}\right]\beta'_V - \overline{N_o}\alpha'_V\right\}\delta V(t) - (\alpha_V + \beta_V)\delta\overline{N_o}(t) \qquad (348)$$

unde am folosit notaţiile simplificatoare:

$$\alpha'_V = \frac{d\alpha}{dV}_V ; \beta'_V = \frac{d\beta}{dV} \qquad (349)$$

iar 'α_V' şi 'β_V' reprezintă valorile constantelor de reacţie voltaj-dependente măsurate în punctul 'V' şi care corespund stării iniţiale de staţionaritate.

În ecuaţia de mai sus (348), necunoscuta o reprezintă variaţia numărului mediu de canale ionice aflate în starea '*open*', la un timp oarecare 't' ($\delta\overline{N_o}(t)$), fenomen produs de o modificare cu δV(t) a diferenţei de potenţial aplicate din exterior. Trebuie notat că am ales asemenea variaţii de diferenţă de potenţial aplicată, încât pantele dependenţelor constantelor de reacţie 'α' şi 'β' au valoare constantă şi sunt egale cu valoarea lor măsurată în punctul 'V'. Aplicând operatorul de transformare Fourier (245) ecuaţiei 348, obţinem:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$(\alpha_V + \beta_V + j\omega)\delta\overline{N_O}(\omega) = \{[N - \overline{N_O}]\beta'_V - \overline{N_O}\alpha'_V\}\delta V(\omega) \quad (350)$$

Aplicând acelaşi operator de transformare Fourier ecuaţiei iniţiale ce exprimă variaţia mică a curentului electric mediu indusă de modificarea infinitezimală a diferenţei de potenţial aplicate la momentul 't' (δV(t)), obţinem:

$$\delta I(\omega) = \gamma\overline{N_O}\delta V(\omega) + \gamma(V - V_{Nernst})\delta\overline{N_O}(\omega) \quad (351)$$

Prin eliminarea lui $\delta N_O(\omega)$ între aceste ultime două ecuaţii şi puţină matematică elementară, obţinem:

$$\frac{\delta I(\omega)}{\delta V(\omega)} = \gamma\overline{N_O} + \frac{\gamma(V - V_{Nernst})}{\alpha_V + \beta_V}\frac{(N - \overline{N_O})\beta'_V - \overline{N_O}\alpha'_V}{1 + j\omega\left(\frac{1}{\alpha_V + \beta_V}\right)} \quad (352)$$

Această relaţie (352) exprimă tocmai valoarea admitanţei complexe de semnal mic a sistemului analizat, liniarizat, ce oferă informaţii despre modificarea curentului electric prin sistemul de canale ionice studiate când diferenţa de potenţial aplicată din exterior se modifică cu o cantitate infinitezimală 'δV'. Prin intermediul dependenţelor de diferenţă de potenţial a constantelor de reacţie 'α_V' şi 'β_V', valoarea acestei admitanţe diferenţiale complexe depinde, implicit, de valoarea de 'plecare' a cantităţii infinitezimale 'δV'. Aşadar, se poate întâmpla ca pentru o aceeaşi modificare a diferenţei de potenţial aplicate din exterior cu un 'δV' oarecare, efectul măsurat în circuit ('δI') să depindă de valoarea iniţială V', corespunzătoare stării iniţiale de staţionaritate a sistemului nostru. Pentru implementarea teoretică a acestui formalism, trebuie ţinut cont de comportamentul capacitiv al biomembranei; astfel, valoarea totală a admitanţei electrice ce trebuie utilizată în expresia pentru determinarea fluctuaţiilor de curent electric:

$$S_I(f) = |G(2\pi f)|^2 S_V(f) \quad (353)$$

unde:

$G(2\pi f) = \dfrac{1}{Z(2\pi f)}$ trebuie să conţină şi componenta capacitivă (C) a biomembranei ($Z_C(\omega) = Z_C(2\pi f) = \dfrac{1}{j\omega C}$).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

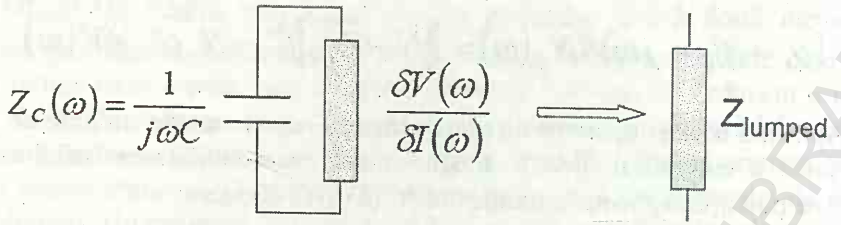


Figura 129 Schema electrică echivalentă de obținere a impedanței totale (Z_{lumped}) a unei membrane biologice ce conține atât o componentă dată de prezența canalelor ionice voltaj-dependente cât și una intrinsecă, de natură capacitivă, dată de compoziția lipidică a membranei.

Din analiza simplă a circuitului de mai sus (Fig. 129), se poate deduce că valoarea impedanței totale a biomembranei studiate este dată de :

$$Z_{lumped}=\frac{Z_C(\omega)\left(\frac{\delta V(\omega)}{\delta I(\omega)}\right)}{Z_C(\omega)+\frac{\delta V(\omega)}{\delta I(\omega)}} \tag{354}$$

În ceea ce privește metoda practică de estimare a impedanței electrice a sistemului studiat, ea se reduce la deducerea directă a unei funcții care să exprime tocmai dependența $|Z(2\pi f)|^2$ de frecvență. Din teoria statistică a fluctuațiilor de semnal în sistemele electrice, prezentată parțial și într-un capitol anterior, știm că există următoarea relație între impedanța unui sistem liniar, densitatea de putere spectrală a unui semnal de tensiune aplicat la capetele sale și densitatea de putere spectrală a curentului electric prin acel sistem :

$$S_V(f)=|Z(2\pi f)|^2 S_I(f)$$
$$deci: \tag{355}$$
$$S_I(f)=\frac{S_V(f)}{|Z(2\pi f)|^2}$$

unde semnificația termenilor este așa cum a fost descrisă anterior.

În cel mai simplu caz, pentru deducerea directă a funcției $|Z(2\pi f)|^2$, la capetele sistemului considerat liniar se aplică un semnal de tensiune electrică fluctuantă de tip '*white noise*' (zgomot alb, pentru care valoarea '*power spectrum*' nu depinde de frecvență); prin măsurarea simultană a răspunsului sistemului dat de fluctuațiile de

BUJASI \ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

curent electric ce apar în circuit, utilizarea relaţiei matematice de mai sus ne permite determinarea experimentală a funcţiei ce dă dependenţa $|Z(2\pi f)|^2$ de frecvenţă.

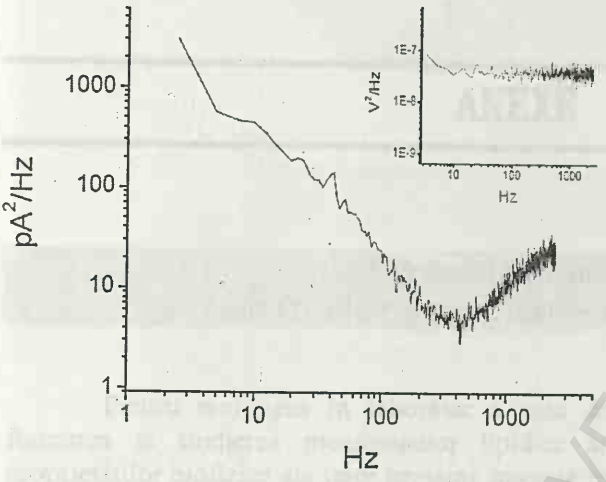


Figura 130 Dependenţa experimentală a densităţii de putere spectrală ('*power spectrum*') a fluctuaţiilor de curent electric printr-o membrană artificială ce conţine nanopori voltaj-dependenţi specifici daţi de oligomeri de alameticină. În '*inset*' este arătată densitatea de putere spectrală a semnalului de tensiune electrică fluctuantă, de tip '*white noise*', aplicat sistemului, şi care generează fluctuaţii de curent electric, a căror '*power spectrum*' este reprezentat alăturat.

În graficul de mai sus (Fig. 130), este prezentat un asemenea exemplu, în care, prin utilizarea metodei descrise anterior, s-a reuşit determinarea răspunsului în fluctuaţii de curent electric al unui sistem biomembranar ce conţinea alameticină şi, implicit, determinarea variaţiei pătratului modulului admitanţei electrice cu frecvenţa (Fig. 131).

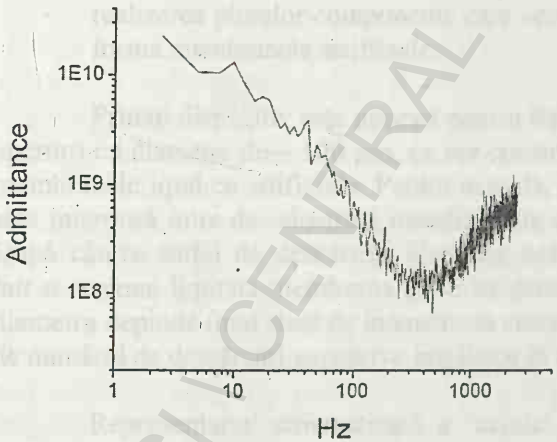
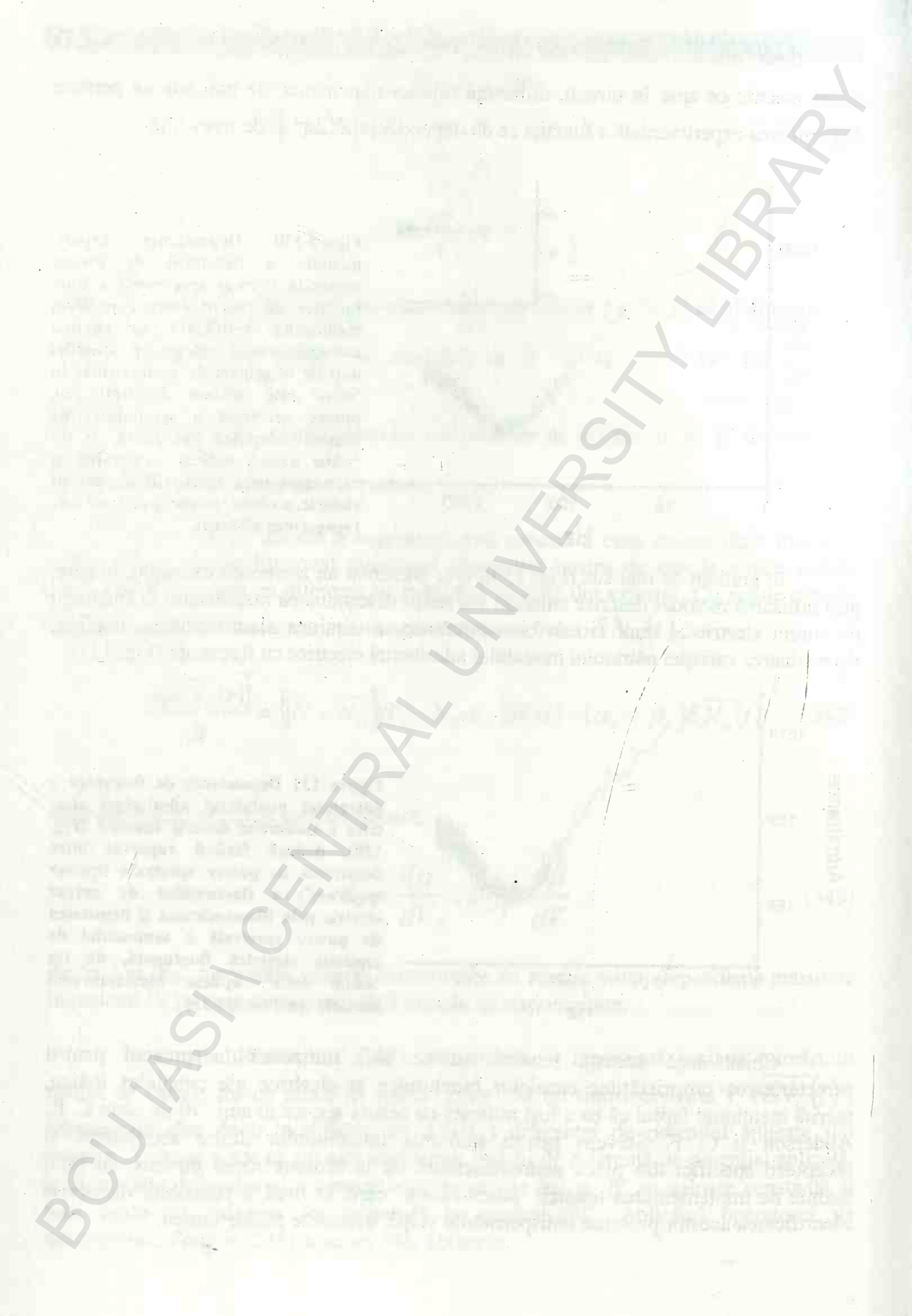


Figura 131 Dependenţa de frecvenţă a pătratului modulului admitanţei electrice a sistemului descris anterior (Fig. 129), dedusă făcând raportul între densitatea de putere spectrală ('*power spectrum*') a fluctuaţiilor de curent electric prin biomembrană şi densitatea de putere spectrală a semnalului de tensiune electrică fluctuantă, de tip '*white noise*', aplicat biomembranei studiate (vezi relaţia 355).

Chiar dacă această tehnică nu se mai utilizează în prezent pentru caracterizarea proprietăţilor canalelor biochimice şi electrice ale canalelor ionice, merită menţionat faptul că ea a fost utilizată cu relativ succes în anii '70 de către C. R. Anderson şi C. F. Stevens pentru studierea intracţiunilor dintre acetilcolină şi receptorii specifici din placa neuromusculară de la broasca *Rana pipiens*, cu mult înainte de implementarea tehnicii '*patch-clamp*' care, în final, a contribuit decisiv la identificarea acestor proteine indispensabile vieţii, denumite canale ionice.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY


BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXE

1. Protocol experimental pentru realizarea membranelor lipidice artificiale

Pentru realizarea în laborator a unui dispozitiv integrat care să permită formarea şi studierea membranelor lipidice artificiale, precum şi investigarea proprietăţilor biofizice ale unor proteine inserate în asemenea membrane, următoarele etape trebuie să fie parcurse iniţial:

- proiectarea şi execuţia unui dispozitiv electric capabil să genereze descărcări electrice în aer;
- realizarea pieselor componente care vor constitui 'celula BLM', în care se vor forma membranele artificiale.

Primul dispozitiv este necesar pentru formarea în membranele de Tefon a unor aperturi cu diametre de ~ 100 μm, ce vor constitui suportul solid pe care se vor forma membranele lipidice artificiale. Pentru aceasta, o bucată dintr-o membrană de Teflon este interpusă între doi electrozi metalici între care se iniţiază o descărcare electrică. După câteva astfel de descărcări electrice, scânteia dintre cei doi electrozi va topi într-o regiune limitată membrana şi se va genera astfel o apertură circulară, a cărei diametru depinde (mai ales) de intensitatea curentului electric de descărcare, precum şi de numărul de descărcări succesive implicate în această procedură.

Reprezentarea schematizată a 'celulei BLM' utilizată drept suport pentru bistratul lipidic artificial, precum şi descrierea electrică simplificată a circuitului de monitorizare şi măsură a curenţilor electrici prin biomembrana artificială sunt reprezentate în figura de la pagina următoare:

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

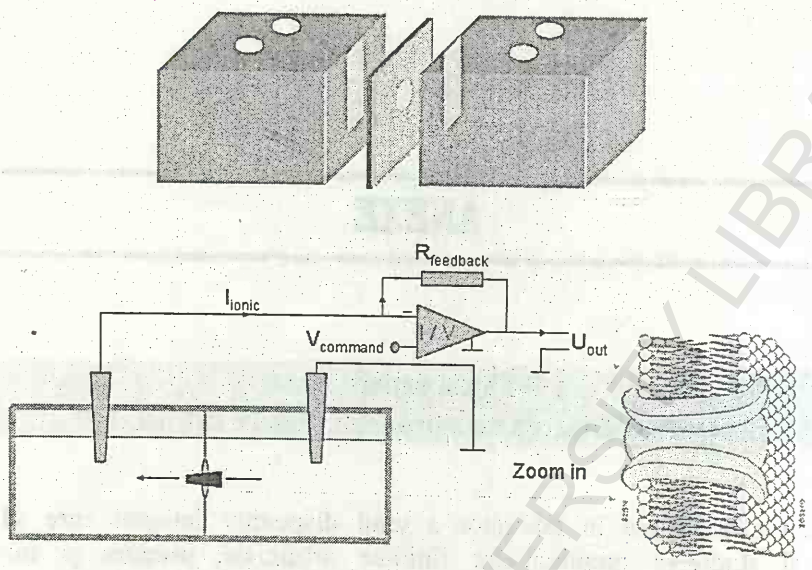


Figura 1 Reprezentarea schematizată a pieselor componente utilizate în constituirea setup-ului pentru realizarea biomembranelor artificiale (sus), precum şi a dispunerii lor în cadrul instalaţiei finalizate (jos). Regiunea mărită (*'zoom in'*) reprezintă o vedere detaliată a membranei formate în partiţia de Teflon ce separă cele două cuve în care, pentru exemplificare, se consideră că este inserat un canal ionic.

Într-o descriere exhaustivă, procedeul de formare a unei membrane lipidice artificiale este iniţiat astfel: o bucată dintr-o folie de Teflon (GoodFellow Cambridge Ltd, England) cu diametrul de ~ 2 cm şi grosimea de 25 μm şi care conţine o apertură circulară formată aşa cum a fost descris mai sus, este aşezată între cele două celule componente realizate din Teflon ale dispozitivului 'celula BLM'. Pentru a facilita izolarea electrică între cele două celule, suprafaţa de contact dintre celule şi partiţia de Teflon a fost acoperită cu o peliculă subţire din vaselină siliconică (Dow Corning, USA). O vedere din profil a sistemului astfel obţinut este arătată în figura de mai sus (Fig. 1). Bistratul lipidic a fost format pe suportul reprezentat de o apertură cu diametrul de aproximativ 100 μm, realizată aşa cum a fost prezentat anterior. Pentru a facilita stabilitatea mecanică a bistratului lipidic, apertura foliei de Teflon a fost pretratată cu o soluţie de 10% (v/v) hexadecane (Sigma-Aldrich) în n-pentane (Sigma-Aldrich). Iniţial, ambele celule ale dispozitivului conţineau soluţie electrolitică cu un volum astfel ales, încât suprafaţa de separaţie apă-aer să fie situată chiar sub apertura din folia de Teflon, aşa cum este reprezentat, schematizat, mai jos (Fig. 2).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

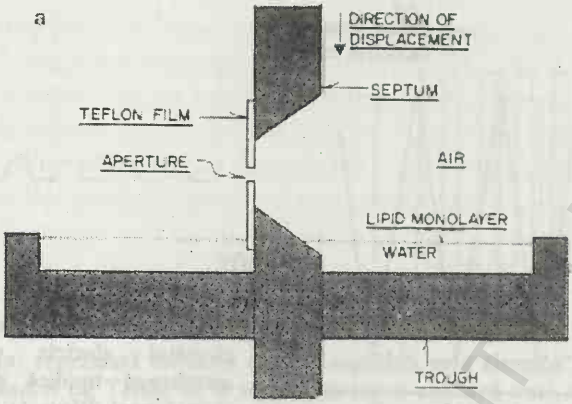


Figura 2 Reprezentare detaliată a aperturii de Teflon ce serveşte drept suport pentru membrana artificială şi care separă cele două compartimente ale celulei BLM.

Pe suprafaţa de separaţie apă-aer din cele două compartimente a fost ulterior depus un volum de ~ 6 μL de 1% (w/v) L-α-phosphatidylcholine (Sigma-Aldrich) dizolvată în pentan. După aproximativ 2 minute, necesare pentru evaporarea cvasicompletă a pentanului, nivelul solventului apos din cele două compartimente a fost ridicat succesiv, în ambele compartimente (Fig. 3).

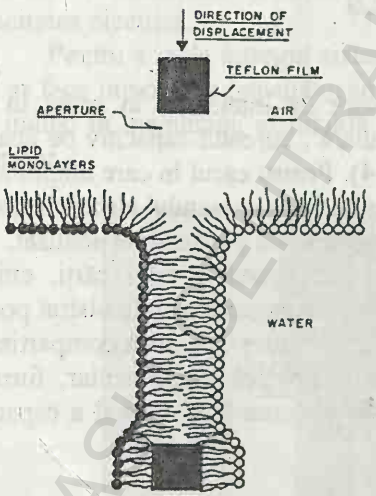


Figura 3 Imagine reprezentativă, schematizată, a protocolului de formare a unei membrane artificiale în apertura de Teflon ce separă cele două cuve ale celulei BLM. Iniţial, lipidele sunt depuse pe suprafaţa de separaţie soluţie apoasă – aer din cele două cuve BLM; după evaporarea solventului lipidic şi apoi ridicarea succesivă a soluţiilor apoase din cele două compartimente, în apertura membranei de Teflon dintre celulele BLM se formează un bistrat lipidic artificial (vezi text).

Datorită interacţiunilor de tip dipol-dipol exercitate între capetele polare ale lipidelor şi moleculele de apă şi a interacţiunilor de tip van der Waals între capetele hidrocarbonate ale moleculelor lipidice, în partiţia din filmul de Teflon se poate forma o structură de bistrat lipidic artificial.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

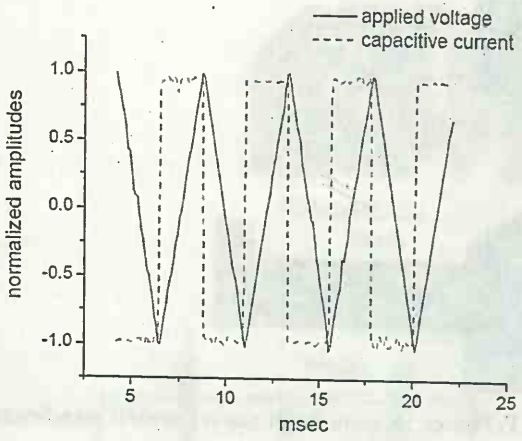


Figura 4 Înregistrare a curentului electric capacitiv (*'capacitive current'*) ce apare în circuitul electric reprezentat de o membrană lipidică artificială, care este supusă unei diferențe de potențial continuă de tip 'triunghiular' (*'applied voltage'*).

Pentru a înțelege fundamentul fizic al monitorizării on-line a formării unui bistrat lipidic artificial, facem apel la o formulă binecunoscută din fizica elementară care exprimă valoarea curentului electric ce apare printr-un capacitor (C) la capetele căruia este aplicată o diferență de potențial variabilă $\Delta V(t)$:

$$I(t) = C\frac{d[\Delta V(t)]}{dt} \qquad (1)$$

Aşadar, utilizând această formulă, este uşor de înțeles că în cazul în care diferența de potențial aplicată are formă 'triunghiulară', curentul capacitiv ce apare în circuit va avea formă 'dreptunghiulară' (vezi Fig. 4). Pentru cazul în care amplitudinea diferenței de potențial aplicată rămâne aceeaşi, amplitudinea curentului electric capacitiv se va mări direct proporțional cu valoarea capacității electrice a sistemului analizat.

Prin prisma cunoştințelor asimilate din parcurgerea acestei cărți, cititorul trebuie să ştie acum că într-o primă reprezentare, formarea structurii de bistrat poate fi observată prin mărirea apreciabilă a rezistenței electrice între cele două compartimente despărțite de ansamblul folie de Teflon-membrană lipidică. Suplimentar, formarea structurii de bistrat poate fi observată şi prin monitorizarea în timp real a capacității electrice a acestui sistem.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

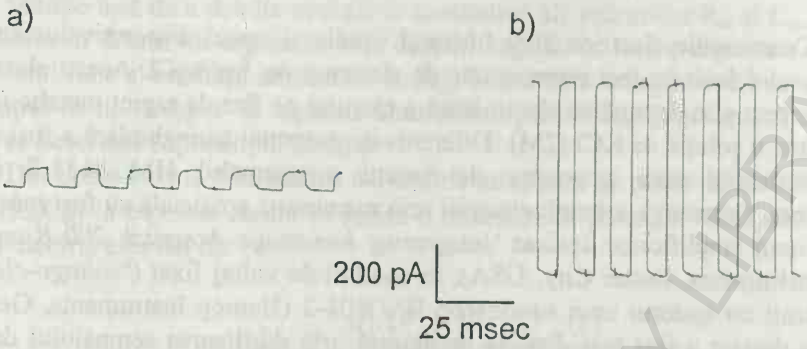


Figura 5 Diagrama (a) reprezintă curentul electric capacitiv prin circuitul electric-echivalent al celulei BLM şi al filmului de Teflon ce le separă, în urma aplicării unei diferenţe de potenţial 'triunghiulare', în absenţa formării unei membrane lipidice artificiale. În urma formării cu succes a unui bistrat lipidic artificial în partiţia de Teflon, capacitatea electrică a sistemului creşte, fapt monitorizat prin mărirea accentuată a curentului electric capacitiv măsurat (b).

În cazul în care, în urma protocolului de formare a membranei artificiale, o astfel de structură ia naştere în partiţia de Teflon, capacitatea electrică monitorizată va creşte şi, în consecinţă, amplitudinea curentului capacitiv care este dependentă direct proporţional cu aceasta, va creşte la rândul ei (Fig. 5, panelul din dreapta). Utilizând capacitori cu valori etalon pentru capacitatea electrică, am reuşit să calibrăm acest procedeu de evaluare a capacităţii membranare, astfel încât pentru orice valoare măsurată a curentului capacitiv înregistrat, am putut estima o valoare pentru capacitatea electrică.

Pentru a izola întregul sistem electric de perturbaţii electromagnetice externe, care ar face imposibile măsurătorile de curenţi electrici foarte mici (~ pA) ce urmează a fi induşi în membrana artificială ulterior, s-a utilizat o cuşcă Faraday, realizată în laborator.

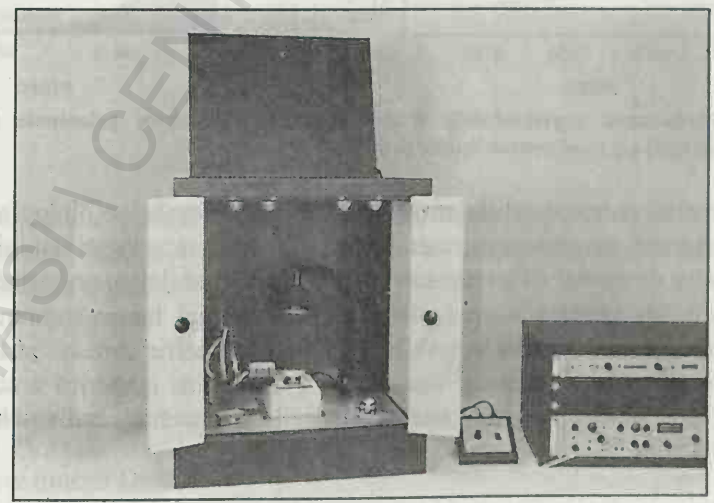


Figura 6 Fotografie ce ilustrează dispunerea celulei BLM în interiorul unei cuşti Faraday.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Conexiunile electrice între bistratul lipidic şi restul dispozitivelor analogice din setup-ul folosit au fost reprezentate de electrozi de Ag/AgCl. Aceşti electrozi au fost concepuţi prin depunerea electrolitică a clorului pe fire de argint metalic (diam. ~ 2 mm), într-o soluţie de KCl (2M). Diferenţa de potenţial triunghiulară a fost aplicată prin intermediul unui generator de funcţii programabil HM 8131-2 (Hameg Instruments, Germany), curenţii electrici prin membrana artificială au fost măsuraţi cu ajutorul unui amplificator dedicat '*integrating headstage Axopatch 200 B amplifier*' (Axon Instruments, Foster City, USA), în condiţii de voltaj fixat ('*voltage-clamp*') şi monitorizaţi cu ajutorul unui osciloscop HM 504-2 (Hameg Instruments, Germany). Achiziţia datelor a fost mai departe optimizată prin digitizarea semnalului de curent electric analogic cu ajutorul unei cartele de conversie A/D cu rezoluţie de 16 biti, PCI NI 6014 (National Instruments, USA), cu o frecvenţă de eşantionare de 10 kHz.

Una din metodele eficiente de evaluare a capacităţii electrice a bistratului lipidic format aşa cum a fost descris mai sus, este descrisă în cele ce urmează şi ilustrată în Fig. 7.

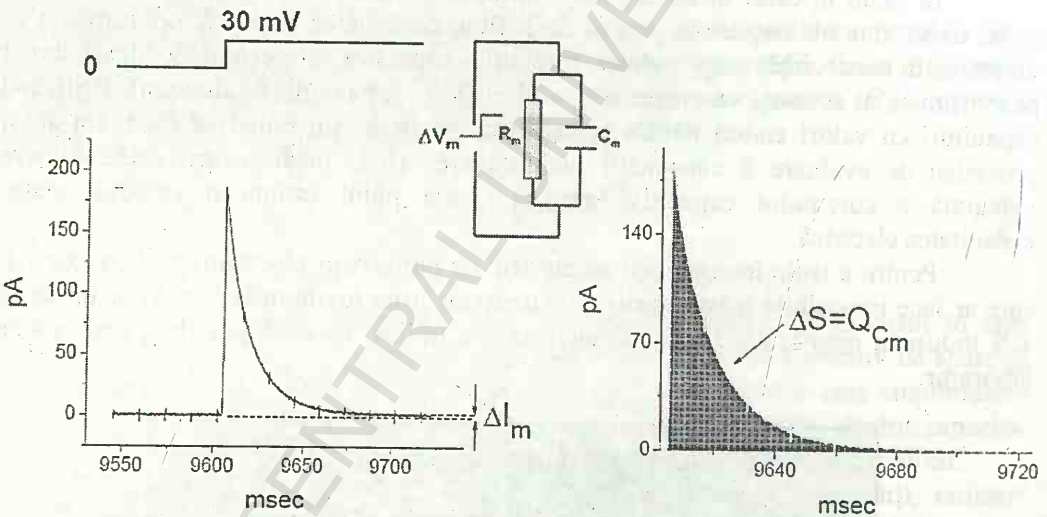


Figura 7 Determinarea experimentală a caracteristicilor electrice principale (rezistenţa şi capacitatea electrică) ale unui bistrat lipidic artificial.

Având în vedere detaliile structurale ale unei membrane biologice, din punct de vedere electric, o asemenea membrană se poate reprezenta cu ajutorul unor elemente pasive de circuit ca un rezistor (R_m) cuplat în paralel cu un capacitor (C_m). În urma aplicării din exterior a unei diferenţe de potenţial transmembranare ΔV_m de forma 'treaptă', în acest circuit se stabileşte un curent electric care variază în timp, aşa cum este arătat în Fig. 7, panelul din stânga. Din analiza numerică a acestui curent electric, se pot determina experimental valorile rezistenţei echivalente R_m şi a capacităţii electrice C_m a biomembranei.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Înainte însă de a detalia evaluările cantitative ale mărimilor R_m şi C_m, este util să explorăm în detalii un aspect ce este deseori neglijat în multe expuneri: care este fundamentul fizic al realităţii exprimate de Fig. 7, şi anume că aplicarea unei diferenţe de potenţial de tip 'treaptă' la capetele unui circuit paralel R_mC_m generează un curent electric ce descreşte exponenţial în timp?

Din considerente elementare de electricitate, ştim că printr-un circuit electric paralel (R_mC_m) la capetele căruia se aplică o diferenţă de potenţial oarecare ($\Delta V_m(t)$), curentul electric este dat de:

$$I(t) = C_m \frac{d[\Delta V_m(t)]}{dt} + \frac{\Delta V_m(t)}{R_m} \tag{2}$$

Cititorul iniţiat în analiza cu ajutorul transformării Laplace a circuitelor electrice liniare, poate verifica un rezultat simplu: în coordonata Laplace (s), răspunsul unui circuit de tipul celui descris mai sus (I(s)) la aplicarea unei diferenţe de potenţial oarecare ($\Delta V(s)$) se poate scrie astfel :

$$I(s) = \Delta V(s)\left(sC_m + \frac{1}{R_m}\right) \tag{3}$$

În cazul simplificat în care valoarea diferenţei de potenţial aplicate este de tip 'treaptă' cu amplitudinea unitară, putem scrie în coordonata Laplace:

$$\Delta V(s) = \frac{1}{s} \tag{4}$$

În aceste condiţii, ecuaţia (3) devine :

$$I(s) = \frac{1}{s}\left(sC_m + \frac{1}{R_m}\right) \tag{5}$$

Prin aplicarea operatorului de transformare Laplace inversă ecuaţiei (5), putem determina funcţia ce exprimă variaţia în timp a curentului electric (I(t)) în condiţiile mai sus enunţate :

$$I(t) = \frac{1}{R_m} + C_m\delta(t) \tag{6}$$

unde $\delta(t)$ este funcţia Dirac ('*delta*').

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ţinând cont de proprietăţile funcţiei Dirac, este uşor de înţeles că ecuaţia (6) nu poate să descrie variaţia exponenţială măsurată experimental, în condiţii similare cu cele expuse în formalismul de mai sus, pentru curentul electric I(t) (Fig. 7, panelul din stânga).

Răspunsul la această (aparentă) dilemă este simplu de dat, dacă analizăm circumstanţele reale în care un asemenea experiment (ca cel expus mai sus, pentru determinarea curentului electric printr-un circuit paralel R_mC_m) are loc. Astfel, este esenţial de înţeles că semnalul de diferenţă de potenţial $\Delta V(t)$ este aplicat invariabil prin intermediul unor conectori electrici reali, ce posedă rezistenţă şi capacitate electrică diferite de zero.

În aceste condiţii, schema electrică echivalentă a circuitului de stimulare electrică a membranei lipidice este următoarea :

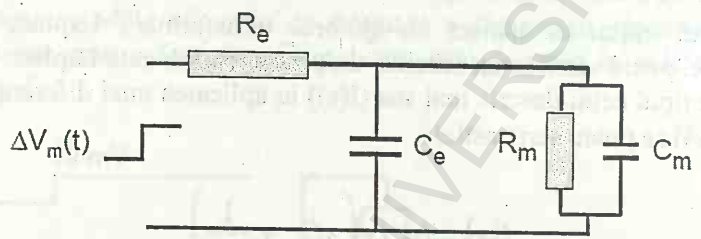


Figura 8 Reprezentarea echivalentă a circuitului de stimulare a unei membrane artificiale caracterizată electric de rezistorul (R_m) cuplat în paralel cu un capacitor (C_m), prin intermediul unor conectori electrici a căror rezistenţă electrică echivalentă este R_e şi capacitate electrică C_e. Valoarea diferenţei de potenţial aplicate circuitului este reprezentată de $\Delta V_m(t)$.

Aplicând din nou operatorul de transformare Laplace ecuaţiei ce descrie variaţia temporală a curentului electric prin circuitul reprezentat în Fig. 8, în urma aplicării diferenţei de potenţial $\Delta V_m(t)$ de tip 'treaptă' cu amplitudine unitară, obţinem :

$$I(s)=\frac{\dfrac{1}{sR_m}+(C_m+C_e)}{1+\dfrac{R_e}{R_m}+sR_e(C_m+C_e)} \tag{7}$$

În continuare, prin aplicarea operatorului de transformare Laplace inversă ecuaţiei (7), putem determina funcţia ce exprimă variaţia în timp a curentului electric (I(t)) prin circuitul din Fig. 8 :

$$I(t)=\frac{1}{R_m+R_e}+\frac{R_m Exp\left(-\dfrac{(R_m+R_e)t}{(C_m+C_e)R_mR_e}\right)}{R_e(R_m+R_e)} \tag{8}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu ajutorul ecuaţiei (8), se poate verifica uşor că formalismul expus mai sus indică, într-o manieră corectă, forma experimentală de variaţie în timp a curentului electric printr-o membrană lipidică ce este stimulată cu o diferenţă de potenţial $\Delta V_m(t)$ de tip 'treaptă' (Fig. 7, panelul din stânga). Cu alte cuvinte, interpunerea între sursa de tensiune de stimulare şi membrana studiată a unor elemente de circuit pasive ce reprezintă descrierea reală a conectorilor utilizaţi, determină variaţia exponenţială, descrescătoare în timp a curentului electric total măsurat în circuit.

În Fig. 7, panelul din stânga, curentul electric 'rezidual' ΔI_m reprezintă valoarea componentei de curent care se scurge prin ramura rezistivă a biomembranei, în condiţiile în care diferenţa de potenţial aplicată ΔV_m este de tip 'treaptă'. Trebuie menţionat că, deoarece rezistenţa electrică a conectorilor şi electrozilor de măsură utilizaţi în astfel de experimente este mult mai mică (~ 1 kΩ) în comparaţie cu cea a membranei (~ 100 MΩ), în evaluările rezistenţei electrice a membranei lipidice artificiale se poate neglija contribuţia acestor elemente de circuit la magnitudinea curentului electric măsurat. Evident, dacă biomembrana s-ar comporta ca un dielectric ideal, rezistenţa electrică a acesteia ar tinde spre infinit, iar curentul electric 'rezidual' ΔI_m ar tinde spre zero. Efectuând repetitiv experimentul reprezentat în Fig. 7, la diferite valori ale diferenţei de potenţial 'treaptă' ΔV_m, se pot măsura diferite valori corespunzătoare ale componentei ΔI_m. Utilizând în continuare reprezentarea grafică a dependenţei $\Delta I_m = \Delta I_m (\Delta V_m)$, se poate deduce, utilizând fitarea acestor date experimentale cu o dreaptă, valoarea rezistenţei echivalente R_m a biomembranei. Pentru a deduce valoarea capacităţii electrice a biomembranei, se poate utiliza un raţionament pe cât de simplu, pe atât de elegant. Se ştie că, prin definiţie, capacitatea electrică a unui sistem este dată de:

$$C = \frac{Q}{U} \tag{9}$$

unde Q reprezintă sarcina electrică ce este stocată în acel sistem, în urma aplicării din exterior a diferenţei de potenţial U.

Prin definiţie, curentul electric total din circuitul electric echivalent al biomembranei (Fig. 7) este dat de:

$$I(t) = \frac{dQ}{dt} \tag{10}$$

Prin integrarea curentului electric din circuitul biomembranei între intervalul de timp iniţial t = 0, când se aplică din exterior diferenţa de potenţial 'treaptă' ΔV_m, şi un timp oarecare t, se poate determina sarcina totală scursă prin circuitul biomembranei în acel interval temporal Δt.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

$$Q_{\Delta t} = \int_0^t I(t)dt \tag{11}$$

Datorită prezenței în circuitul electric echivalent al biomembranei a rezistenței R_m, cu cât Δt este mai mare, cu atât $Q_{\Delta t}$ va fi mai mare. Pentru a determina corect sarcina electrică stocată între armăturile capacitorului C_m, și care este numeric egală cu aria ΔS (Fig. 7, panelul din dreapta) vor trebui respectați următorii pași:

1. integrala de mai sus să fie făcută doar până la acel moment temporal când încărcarea condensatorului este completă, adică până când variația curentului electric prin circuit devine nulă. Din acel moment, singura contribuție la variația de sarcină electrică în circuitul biomembranei este dată de prezența rezistorului R_m în câmpul electric creat de diferența de potențial ΔV_m.
2. din valoarea sarcinii electrice scursă prin circuitul biomembranei, așa cum s-a procedat la punctul precedent, trebuie scăzută algebric contribuția sarcinii electrice care se scurge prin rezistorul R_m. Justificarea simplă a acestei afirmații este dată de legea I a lui Kirckhoff:

$$I(t) = I_{C_m}(t) + I_{R_m}(t) \tag{12}$$

În acest fel, valoarea rezultantă a integralei calculată va fi numeric egală cu sarcina electrică Q_{C_m} stocată între 'armăturile' condensatorului C_m. Valoarea lui C_m se calculează în continuare după expresia:

$$C_m = \frac{Q_{C_m}}{\Delta V_m}. \tag{13}$$

Datorită faptului că rezistența electrică a conectorilor și electrozilor de măsură utilizați în astfel de experimente este relativ mică (~ 1 kΩ), în comparație cu cea a biomembranei – așa cum am precizat și mai sus – și valoarea capacității electrice a conectorilor și electrozilor de măsură este mai mică cu mai mult decât un ordin de mărime în comparație cu valoarea capacității electrice a bistratului lipidic, formula (13) evaluează foarte bine cantitativ valoarea măsurată a capacității electrice a membranei lipidice.

Trebuie menționat că, experimental, amplitudini diferite ale diferenței de potențial 'treaptă' aplicate (ΔV_m) pot conduce la evaluări diferite ale capacității electrice a membranei lipidice. Fără a intra în detalii explicative, menționăm doar că aceasta se datorează fenomenului de electrostricțiune care, în acest caz, se traduce printr-o deformare elastică a membranei lipidice sub influența câmpului electric

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

aplicat din exterior. În acest sens, dependenţa explicită de diferenţa de potenţial aplicată (U) a capacităţii unei membrane lipidice este dată de:

$$C_m(U) = C_0\left(1 + \alpha U^2\right) \tag{14}$$

unde C_0 este capacitatea minimă a membranei, iar α [V^{-2}] este o constantă de material, caracteristică compoziţiei lipidice specifice oricărei membrane.

Pentru evaluarea proprietăţilor rezistive ale sistemului membranar format, se utilizează analiza diagramelor curent-tensiune corespunzătoare (Fig. 9).

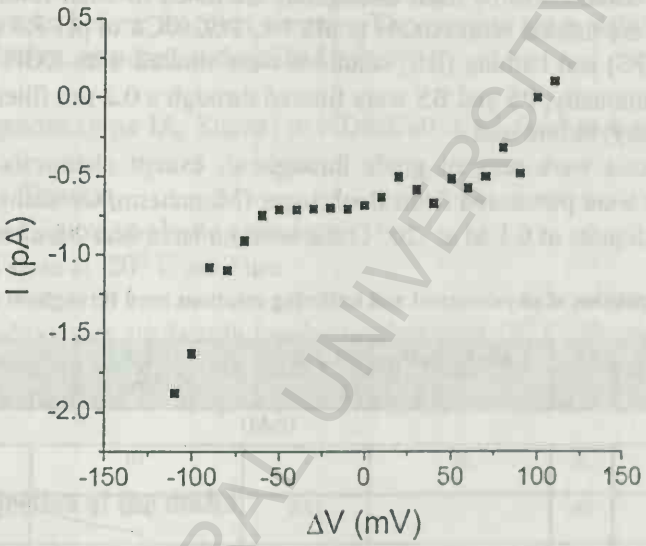


Figura 9 Digrama curent-tensiune pentru un bistrat lipidic artificial, realizat cu ajutorul dispozitivului descris mai sus.

Pentru aceasta, dintr-o sursă externă se aplică de o parte şi de alta a biomembranei artificiale valori diferite ale diferenţei de potenţial şi se măsoară valoarea curentului electric rezultat prin biomembrană. Aşa după cum este arătat în Fig. 9, răspunsul rezistiv al biomembranei este, mai degrabă, limitat, prin aceea că +/- 100 mV duc la stabilirea unui curent electric transmembranar de doar 0.3/0.9 pA. Această proprietate de relativă joasă conductivitate electrică a membranelor lipidice artificiale este eficient exploatată pentru studierea proprietăţilor electrice ale canalelor ionice şi ale nanoporilor artificiali sau naturali, incluşi biochimic în asemenea membrane.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Protocol experimental pentru pregătirea măsurătorilor de electrofiziologie pe canale ionice GIRK1/GIRK4 exprimate genetic în oocite de la broasca *Xenopus Laevis*

2.1 Buffer solutions

Buffer solutions to be used throughout are listed in what follows. ND96 and hK solutions were titrated with NaOH to pH 7.8, PG200Ca to pH 7.5 and CHAPS to pH 8; pipette (PS) and bathing (BS) solutions were titrated with KOH to pH 7.5 (see Table 14). Additionally, PS and BS were filtered through a 0.2 μm filter (Schleicher & Schuell, Germany) before use.

Chemicals were reagent grade throughout, except chemicals for molecular biology, which were purchased from Boehringer (Mannheim, Germany). GTP-γS was stored în 2 μl aliquots of 0.1 M at -20° C and used no later than 2 h after thawing.

Table 1 The composition of physiological and buffering solutions used throughout experiments

	ND96	hK	CHAPS buff.	PG200Ca	BS (bathing sol.)	PS (pipette sol)
	(mM)					
NaCl	96	2	50	-	10	-
KCl	2	96	-	37.5	140	150
$CaCl_2$	1	1	-	1	-	1
$MgCl_2$	1	1	-	1	4	1
HEPES	5	5	20	10	10	10
$GdCl_3$	-	-	-	-	-	0.05
EGTA	-	-	-	-	1	-
Na-ATP	-	-	-	-	1	-
L-Glu			-	180	-	-
DDT	-	-	3	-	-	-
CHAPS	-	-	11.4	-	-	-

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

For experiments which required absence of Mg^{2+} from the bath solution, the corresponding composition of BS0Mg was similar to normal BS (as described above), except $MgCl_2$ (not added) and EGTA (1 mM) was replaced with EDTA (1mM).

2.2. Oocyte preparation

Xenopus Laevis frogs were anesthetized în 0.15 % methanesulfonate and dissected, by opening a small incision în the abdomen, which was sutured after the removal of the desired amount (100-200) of the oocytes from the ovary. After the recovery from anesthesia, the animal was returned to the tank and allowed to rest for at least four weeks before the next surgery. The oocytes were defolliculated using collagenase solution, prepared as described below:

- Add collagenase (type IA, Sigma) to ND96Ca0 (Ca^{2+} free) to a concentration of 1.5 mg/ml
- Sterilize by filtration
- Place 10 ml aliquots în plastic eprouvettes
- Freeze and store at -20° C until use

Selected oocytes are kept în regular incubators at 19° C. No more then twenty oocytes per petri-dish are placed în NDE (ND96 which has been supplemented with 2.5 mM pyruvate, 0.5 mM theophylline and 50 mg/l gentamycin).

2.3. Injection of the mRNA

This procedure is best carried out in a laminar flow, one day after oocytes isolation. Injection needles are pulled from soft-glass tubes (10 µl Drummond Microdispenser, The Drummond Scientific Company, USA) on a regular microelectrode puller.
The whole procedure consists of the following steps:

- Clean working area with 80 % Et-OH
- Prepare Pasteur pipette for oocytes (cut & heat polish)
- Select healthiest oocytes to be injected and put them în separate dish în NDE
- Pull injection needle (with David-Kopf puller)
- Prepare petri-dish; scratch bottom with a sterile needle (to obstruct oocyte' s movement when the needle is about to penetrate it)
- Fill a 10 ml syringe with paraffin oil
- Break the tip of the injection needle to ≈ 30 µm

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Backfill the injection needle to ≈ 1 cm with paraffin oil and insert it in the Drummond microdispenser (The Drummond Scientific Company, USA), which is attached to a mechanical micromanipulator (No. 8454, Narishige, Japan)
- Prepare mRNA, dilute it to the desired concentration with ddH_2O (RNAse free – Aqua 'Leopold', Leopold Pharma, Austria) and suck it into the injection needle
- Inject ≈ 50 nl mRNA solution în each oocyte (oocytes are placed în NDE)
- Place no more then twenty oocytes in 35 mm petri-dishes, put then in incubator at 19° C, and allow 4 to 5 days for the mRNA expression.

Note: Since the human skin secrets continuously high amounts of RNAses, it is highly recommended that the injection procedure is carried out with hands protected with disposable gloves. Besides, all plasticwares involved in mRNA storing & handling must be fresh and sterilized by autoclaving. All above steps were performed under an upright stereomicroscope (Stemi SV6, Zeiss, Germany).

2.4. Single-channel recording

In order to make possible patch-clamp experiments on frog oocytes, the non-cellular vitteline layer which coats any oocyte must be removed; this was accomplished by placing oocytes for 3 to 6 minutes into hypertonic solution (PG200Ca – which promotes their shrinking), and the vitteline layer (that does not shrink) removed with sharp forceps under a stereomicroscope (Stemi SV6, Zeiss, Germany).The devitellinized oocyte was placed into a recording chamber with a volume of 500 µl, filled with BS.

Pipette electrodes were pulled (using a L/M-3P-A electrode puller) from softglas (Assistent No. 564, Micro-Hematocrit capillary tubes), and various tip diameters were achieved by varying the intensity of the electrical current through the filament.

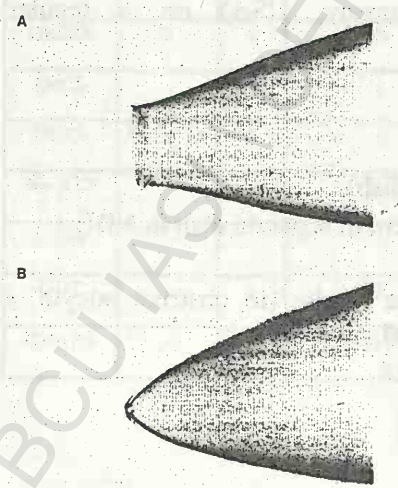


Fig. 10 Upper panel (A) from the picture shown above represents the an example of what a pipette tip looks like immediately after pulling. In order to promote good quality gigaohm seals and to reduce the possibility of tip penetration into the cell during seal formation, electrode tips require fire polishing (lower panel, B). This was done under an upright microscope (Leitz, Portugal), by gradually approaching an electrically heated platinium-iridium wire (which is generally bent into a very fine hairpin, so that is can be brought to within a few microns of the electrode tip) connected to a mechanical micromanipulator (No. 10434, Narishige, Japan) to the electrode tip until the desired degree of polishing is achieved (B).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Before using, capillary tubes were cleaned according to the protocol described below and stored protected from dust until use.

Boil capillaries 30 minutes (for each solution) in:

- 1 M KOH
- 1 M HNO_3
- 3 times în ddH_2O
- EtOH (reagent grade)

Purge each capillary with a 2/1 $CHCl_3$/EtOH solution, dry and store protected from dust.

Next table (Table 2) lists the properties of a number of glasses that have been used for patch-clamping:

Table 2 Partial description (electrical and termical) of some of the glass sorts used for patch-clamping

GLASS	LOSS FACTOR	DIEL. CONSTANT	SOFTENING TEMP. (^{O} C)	DESCRIPTION
7940	.0038	3.8	1580	Quartz
1724	.0066	6.6	926	Aluminosilicate
Sylgard	.58	2.9	-	Coating compound
7760	.79	4.5	780	Borosilicate
N-51A	3.70	5.9	785	Borosilicate
KG-12	1.00	6.7	632	High lead
7720	1.30	4.7	755	Tungsten seal
0080	6.50	7.2	695	Soda lime
KG-33	2.20	4.6	827	Kimax borosilicate

3. Codul genetic standard

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. Simbolurile utilizate pentru aminoacizi

A	Ala	Alanina
B	Asx	Asparagina sau Acid aspartic
C	Cys	Cisteina
D	Asp	Acid aspartic
E	Glu	Acid glutamic
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Threonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofan
Y	Tyr	Tirosina
Z	Glx	Glutamina sau Acid glutamic

5. Constante fizice universale

Constanța fizică	Simbol	Valoare
Unitate atomică de masă (dalton)	Da	1.660×10^{-24} g
Numărul lui Avogadro	N	6.022×10^{23} mol^{-1}
Constanța lui Boltzmann	k	1.381×10^{-23} J K^{-1}
Electron volt-ul	eV	1.602×10^{-19} J
Constanța lui Faraday	F	9.649×10^{4} C mol^{-1}
Sarcina electronică elementară	e	1.602×10^{-19} C
Constanța generală a gazelor	R	8.314 J mol^{-1} K^{-1}
Constanța lui Planck	h	6.626×10^{-34} J s
Viteza luminii în vid	c	2.998×10^{8} m s^{-1}
Permitivitatea electrică a vidului	ε_0	8.854×10^{-12} F m^{-1}

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY
B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI FIZICĂ

Bibliografie

1. Biochemistry (4th edition), 1995. Stryer, L., W. H. Freeman and Company, New York
2. Luchian, T. 1997. *'Gating modulation of a G-protein-activated inwardly-recifying potassium channel by a cytosolic applied peptide'*, Ph.D. Thesis, 'Karl-Franzens' University of Graz (Austria)
3. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 1992. Hille, B., Sinauer Associates, Inc.
4. *Voltage and patch clamping with microelectrodes*, 1985. Eds. Smith, T., Jr. et al, Baltimore, Williams & Wilkins
5. Mereuță, L., Luchian, T. 2005. *Journal of Cellular and Molecular Medicine 9: 446-456*
6. Cernescu, A., Luchian, T. 2006. *Central European Journal of Physics*, in press
7. Luchian, T., Mereuță, L. 2006. *Bioelectrochemistry*, in press
8. Luchian, T. 2004. *Advances in Micro- and Nanoengineering* 6: 42-53
9. Schirmer, T. 1998. *Journal of Structural Biology* 121: 101–109
10. Bezrukov , S. M., Kasianowicz, J. J. 1993. *Physical Review Letters* 70
11. Philippsen, A., Im, W., Engel, A., Schirmer, T., Roux, B., Muuller, D. J. 2002. *Biophysical Journal* 82: 1667–1676
12. Lewis, R. J., Nielsen, K. J., Craik, D. J., Lounghnan, M. L., Adams D. A., Sharpe, I. A., Luchian, T., Adams, D. J., Bond, T., Thomas L., Jones, A., Matheson, J.-A., Drinkwater, R., Andrews, P. R., Alewood, P.F. 2000. J. Biol. Chem. 275:45: 35335 - 35344
13. Luchian, T., Lewis, R. J., Adams, D. J. 1999. *Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society* 30(2): 95
14. Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich 1990. J. Gen. Physiol. 95: 29-60
15. Catterall, A. W. 1988. Science 242: 50-61
16. Molecular Cell Biology (3rd edition), 1995. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Darnell, J. W. H. Freeman and Company, New York
17. Armstrong C. M. and B. Hille 1998. Neuron 20: 371-380
18. Yellen, G. 1999. Curr. Opin. Neurobiol. 9: 267-273
19. Unwin, N. 1993. Cell 72: 31-41
20. *Membrane Transport in Biology*, 1978. Giebisch, G., Tostenson, D. C., Ussing, H. H. editrs., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York
21. Miller, C. 1989. *Neuron* 2: 1195-1205

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

22. Hodkin, A. L., Huxley, A. F., Katz, B. 1952. J. *Physiol. (London)* 108: 37-77
23. Cole, K. S. 1949. *Arch. Sci. Physiol.* 3: 253-258
24. Hodkin, A. L. and A. F. Huxley 1952 a. J. *Physiol. (London)* 116: 449-472
25. Lester, H. A. 1991. *Annu. Rev. Physiol.* 53: 477-496
26. Narahashi, T. 1974. *Physiol. Rev.* 54: 813-889
27. Henderson, R. and J. H. Wang 1972. *Biochemistry* 11: 4565-4569
28. Catterall, W. A. 1988. *Science* 242: 50-61
29. *Ion Channel Reconstruction*, 1986. Miller, C. Plenum Press, New York
30. Sigworth, F. J. 1993. Q. *Rev. Biophys.* 27: 1-40
31. Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W. 1990. *Science* 250: 533-538
32. Armstrong, C. M. and F. Bezanilla 1974. J. *Gen. Physiol.* 63: 533-552
33. Parsegian, A. *Nature* 221:844–846
34. *The Feynmann Lectures on Physics*, Volume II, 1963. Feynman, R. P., Leighton, R. B., Sands, M., Reading, MA: Addison-Wesley
35. Catterall, W. A. 2000. *Neuron* 26: 13–25
36. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition, 2004. Nelson, D. L, Cox, M. M., Freeman, W. H.
37. *Biochemistry* 3rd ed, 2005. Garrett, R., Grisham, C. M.
38. Nestorovich, E. M., Rostovtseva, T. K., Bezrukov, S. M. 2003. *Biophys.* J. 85: 3718-3729
39. Dascal, N. and I. Lotan 1992. In: *Methods in Molecular Neurobiology* 13, A. Longstaff and P. Revert editrs., Totowa NJ: Humana Press, 205-225
40. *Single-Channel Recording* (2nd Edition), 1995. B. Sakmann and E. Neher, Plenum Press
41. *The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques*, 1993. *Axon Instruments*, Inc.
42. *Introduction to Membrane Noise*, 1981. DeFelice, L. J., Plenum Press, New York
43. *Intermolecular and Surface Forces*, 1987. Israelachvili, N. J., Academic Press
44. *Statistical Physics*, 1991. Kubo, R., Toda, M., Hashitsume, N., Springer-Verlag
45. *Stochastic Processes in Physics and Chemistry*, 1992. Van Kampen, N. G., North Holland
46. Laio, A., Torre, V. 1999. *Biophys.* J. 76: 129-148
47. Luchian, T. 2001. *BBA-Biomembranes* 1512: 329-334
48. Shin, S. H., Luchian, T., Cheley, S., Braha, O., Bayley, H. 2002. *Angew Chem Int Edit* 41: 3707-3709
49. Luchian, T., Shin, S. H., Bayley, H. 2003. *Angew Chem Int Edit* 42: 1925-1929
50. Luchian, T., Shin, S. H., Bayley, H. 2003. *Angew Chem Int Edit* 42: 3766-3771

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

51. Shin, S. H., Luchian, T., Cheley, S., Braha, O., Bayley, H. 2003. *Biophysical* J. 84: 125A-125A
52. Gillespie, D.T. 2000. J. Chem. *Phys.* 113: 297–306
53. Bai, C., Wang, C., Xie, X.S., *Wolynest*, P.G. 1999. PNAS 96: 11075–11076
54. Cevc, G. 1990. Biochim. *Biophys.* Acta 1031: 311–382
55. McLaughlin, S. 1989. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18: 113–136
56. Carius, W. 1976. J. *Colloid Interface Sci.* 57: 301–307
57. Sigworth, F. J. 2003. *Nature* 423: 21-22
58. Giorgetti, A., Carloni, P. 2003. *Current Opinion in Chemical Biology* 7: 150-156
59. Zhou, Y., MacKinnon, R. 2003. *J. Mol. Biol.* 333: 965–975
60. MacKinnon, R. 2003. *FEBS Letters* 555: 62-65
61. Karki, J. *Digital Signal Processing Solutions April* 1998, Texas Instruments
62. Viloca, M. G., Gao, J., Karplus, M., Truhlar, D. G. 2004. Science 303: 186-195
63. Nestorovich, E. M., Danelon, C., Winterhalter, M., Bezrukov, S. M. 2002. PNAS 99: 9789-9794
64. Kullman, L., Winterhalter, M., Bezrukov, S. M. 2002. *Biophys.* J. 1 82 803–812

BCU IASI \ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Electrofiziologia moleculară reprezintă astăzi un domeniu de studiu de avangardă în biofizica celulară şi moleculară; astfel, investigaţiile electrice ale proteinelor şi membranelor biologice pot oferi răspunsuri esenţiale privitoare la funcţionarea integrativă a celulelor şi ţesuturilor biologice. Instrumentele matematice şi câteva din tehnicile experimentale prezentate în această lucrare pot fi utile tuturor celor care studiază proprietăţile fizice ale nanoporilor proteici şi sintetici.

Subiectele cheie abordate în această lucrare se referă la caracterizarea structurală şi funcţională a nanoporilor biologici, precum şi la caracterizarea fenomenelor de transport şi cinetice ale acestora. Fără a fi extrem de solicitantă din punct de vedere al limbajului matematic şi fizic utilizat, această carte reflectă totuşi aspecte de detaliu privitoare la tehnici esenţiale din electrofiziologia moleculară (e.g., '*voltage-clamp*', '*patch-clamp*') şi instrumente de analiză stochastică a semnalelor electrice mediate de nanopori biologici.

Autorul este conferenţiar universitar doctor la Facultatea de Fizică, Laboratorul de Biofizică şi Fizică Medicală, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza" Iaşi.

I.S.B.N.: 973-670-154-9

BCU IASI | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY